

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/JP05/006527

International filing date: 28 March 2005 (28.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-092570  
Filing date: 26 March 2004 (26.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2004年 3月26日

出願番号 Application Number: 特願2004-092570

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号

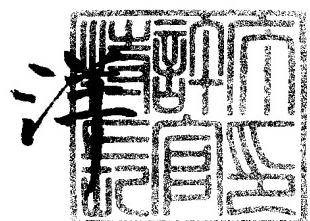
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

出願人 Applicant(s): 株式会社ロコモジエン

2005年 4月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P04-038  
【提出日】 平成16年 3月26日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 48/00  
【発明者】  
　【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区中川1-2-5 港北ガーデンヒルズA棟  
　【氏名】 中島 利博  
【発明者】  
　【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区新石川2丁目16番地の7 石川坂マンシ  
　【氏名】 山崎 聰士  
【発明者】  
　【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区長沢1-34-18 トウワコテ長沢30  
　【氏名】 土持 兼之  
【発明者】  
　【住所又は居所】 神奈川県大和市桜森2-4-14 レックス相模大塚駅前205  
　【氏名】 加藤 幸裕  
【発明者】  
　【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区寺尾台1-21-16 大滝ハイツ201  
　【氏名】 天野 敏也  
【発明者】  
　【住所又は居所】 東京都小金井市中町3-22-10-313 小金井中町マンシ  
　【氏名】 田光 香  
【特許出願人】  
　【識別番号】 503302207  
　【氏名又は名称】 株式会社ロコモジエン  
【代理人】  
　【識別番号】 100092783  
　【弁理士】  
　【氏名又は名称】 小林 浩  
　【電話番号】 03-3273-2611  
【選任した代理人】  
　【識別番号】 100095360  
　【弁理士】  
　【氏名又は名称】 片山 英二  
【選任した代理人】  
　【識別番号】 100093676  
　【弁理士】  
　【氏名又は名称】 小林 純子  
【選任した代理人】  
　【識別番号】 100120134  
　【弁理士】  
　【氏名又は名称】 大森 規雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100124305

【弁理士】

【氏名又は名称】 押鴨 涼子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 157061

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0314062

**【書類名】特許請求の範囲**

**【請求項 1】**

シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写因子と結合してプロモーター活性を阻害することができるデコイ核酸。

**【請求項 2】**

以下の (a) 又は (b) のデコイ核酸。

(a) 配列番号 1 1 若しくは 1 2 に示される塩基配列からなるデコイ核酸

(b) 配列番号 1 1 若しくは 1 2 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸

**【請求項 3】**

以下の (a) 又は (b) のデコイ核酸。

(a) 配列番号 1 1 及び 1 2 に示される塩基配列からなるデコイ核酸

(b) 配列番号 1 1 及び 1 2 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸

**【請求項 4】**

シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能が、シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写因子と結合する機能である、請求項 2 又は 3 記載の核酸。

**【請求項 5】**

EBS、SBS 及び ABS からなる群から選ばれるいづれかの転写因子結合部位の塩基配列に基づいて設計された請求項 1 ~ 4 のいづれか 1 項に記載の核酸。

**【請求項 6】**

請求項 1 ~ 5 のいづれか 1 項に記載の核酸を含む、シノビオリン遺伝子の発現に起因する疾患を治療又は予防するための医薬組成物。

**【請求項 7】**

さらに、薬学的に許容可能なキャリアーを含む、請求項 6 記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

疾患が、関節リウマチ、線維症、癌及び脳神経疾患からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである、請求項 6 又は 7 記載の医薬組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】シノビオリン遺伝子のプロモーターに対するデコイ核酸

【技術分野】

【0001】

本発明は、シノビオリン遺伝子のプロモーターに対するデコイ核酸に関する。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチ（以下、RAという）は、関節の滑膜組織に異常な増殖が見られる全身性の慢性炎症性疾患である。本発明者は、この滑膜組織の異常増殖に必須の遺伝子としてシノビオリン（Synoviolin）遺伝子を同定している（WO 02/052007；特許文献1）。

【0003】

シノビオリン遺伝子がコードしているシノビオリンは、関節リウマチ患者の滑膜細胞ライブラリーから、抗滑膜細胞抗体を用いた免疫スクリーニングによりクローニングされた膜タンパク質である。シノビオリンをマウスで過剰発現させた場合、関節では、滑膜の増生、骨、軟骨破壊が認められ、関節炎と酷似した症状が確認されたため、軟骨・骨組織の発生、分化、再生および代謝へのシノビオリンの関与が示唆されている。また、最近では、シノビオリンが線維症、癌又は脳神経疾患の発症にも関与することが見出されている（非特許文献1）。

【0004】

シノビオリンの発現量は上記の疾患において重要であると考えられるため、シノビオリンプロモーターの転写領域を検索するために、マウスシノビオリン遺伝子の上流プロモーター領域を切断して種々の長さを有する断片についてプロモーター活性を調べた結果、そのコア領域が特定され、転写因子と相互作用することが確認されている（非特許文献2）。

【特許文献1】国際公開第 02/052007号パンフレット

【非特許文献1】Genes Dev. 2003 Vol. 17:2436-49 [Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy].

【非特許文献2】Oncogene. 2000 Vol. 19:6533-48 [Ets target genes: past, present and future]

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写調節領域をコードする部位に対するデコイ核酸を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。そして、シノビオリン遺伝子の上記の部位に対するデコイ核酸を作製することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写因子転写因子と結合してプロモーター活性を阻害することができるデコイ核酸。

【0008】

本発明のデコイ核酸は、例えば以下の(a)又は(b)のデコイ核酸を例示することができる。

【0009】

(a) 配列番号11若しくは12に示される塩基配列からなるデコイ核酸

(b) 配列番号11若しくは12に示される塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸

また、本発明のデコイ核酸は、例えば以下の(a)又は(b)のデコイ核酸を例示することができる。

#### 【0010】

- (a) 配列番号11及び12に示される塩基配列からなるデコイ核酸
- (b) 配列番号11及び12に示される塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸

シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能としては、例えばプロモーターの転写因子と結合する機能が挙げられる。

#### 【0011】

本発明のデコイ核酸は、プロモーターの転写因子の結合部位であるEBS、SBS及びABSからなる群から選ばれるいずれかの部位の塩基配列に基づいて設計することができる。

(2) 上記デコイ核酸を含む、シノビオリン遺伝子の発現に起因する疾患を治療又は予防するための医薬組成物。

#### 【0012】

本発明の医薬組成物は、さらに、薬学的に許容可能なキャリアーを含むものでもよい。本発明の医薬組成物の適用の対象となる疾患としては、例えば、関節リウマチ、線維症、癌及び脳神経疾患からなる群から選ばれる少なくとも1つが挙げられる。

#### 【発明の効果】

#### 【0013】

本発明により、シノビオリン遺伝子のプロモーターに関するデコイ核酸が提供される。本発明のデコイ核酸は、シノビオリンの転写因子結合部位において、この転写因子と競合的に結合することができ、その結果、シノビオリンプロモーターの活性を抑えることができる。このことは、本発明のデコイ核酸が関節リウマチ等の各種疾患の治療に有用であることを意味する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0014】

以下、本発明を詳細に説明する。

##### 1. 概要

本発明者は、シノビオリンを中心としたリウマチ病態解析を行っている。最近、シノビオリンノックアウトマウスを用いた解析において、ERストレスによるアポトーシス誘導の域値にERADの機能を担うシノビオリンの量が関与していることを見出した。

#### 【0015】

そこで、アポトーシス誘導の感受性を決定するシノビオリンの量を調節する転写機構を解明するためにプロモーター解析を行い、マウス細胞株及びマウス胚を用いてシノビオリンの構成的発現を担うEts結合部位(EBS; Ets binding site)を同定し、そのエレメントがin vivoにおいてシノビオリンの発現に必須であることを証明した。Etsは、酵母からヒトまで保存されている転写因子である。Etsドメインは、30種類以上のファミリーを形成し、その多くが分化・増殖・アポトーシスを担う分子の転写活性を担っている(D. K. Watson and A. Seth.; Oncogene. review issue. Dec 18; 19(55); 2000)。また、NIH3T3細胞において、そのEBSを介しEts ファミリーの一つGABP $\alpha/\beta$ 複合体がその転写制御に関与していることを示した。

#### 【0016】

シノビオリンの発現は、ヘテロノックアウト(LacZ knock in mouse)の発現解析、ノーザン、ウエスタンによる解析によればユビキタスであり、多くの細胞においてシノビオリンの発現が必要とされていることが考えられる。このことは、シノビオリンノックアウトマウスが全身性のアポトーシス亢進にて胎生致死であることからも推察される。但し、その発現には強弱があり、特に分泌能力の高い細胞(臍臓、精巣、神経細胞)においてその発現が強い。このことは、一部の細胞においては、シノビオリンの発現が非常に高く要求されていると考えられる。

## 【0017】

転写制御機構には、(i) 基本転写複合体を含む構成的遺伝子発現と、(ii) ある刺激に対する誘導的遺伝子発現がある。シノビオリンのプロモーターにはTATAボックス、イニシエーター配列が存在しない。このようなプロモーター構成の場合、SP1やEts ファミリー等の転写因子がその転写誘導において重要である (Rudge, Exp Cell Res. Mar 10; 274(1): 45-55. 2002)。

## 【0018】

具体的な転写因子としては、GABP $\alpha$ 、GABP $\beta$ 、GABP $\alpha$ とGABP $\beta$ との複合体、Ets1、Tel、Fli-1などが挙げられる。

## 【0019】

GABP $\alpha$ は、EtsドメインをもつEtsファミリーの一つであり、454アミノ酸を有するタンパク質である。GABP $\alpha$ は、細胞においてユビキタスに発現し、Etsドメインを介し、GABP $\beta$ とヘテロ2量体を形成する。さらに、GABP $\alpha$ は、2つのEts結合部位を使用して、ヘテロ4量体を形成することが知られている。また、ターゲット遺伝子の転写制御においていくつかの特徴を有する。まず、GABP $\alpha$ はEtsドメインによるDNA結合能は有するが、転写活性化能は有しない。これに対し、GABP $\beta$ は、DNA結合能は有しないが、GABP $\alpha$ と2量体を形成することにより転写活性を誘導し、ヘテロ4量体を形成することによりさらに高い転写活性化能を発揮する (Yu M. J Biol Chem Nov 14; 272(46): 29060-7. 1997)。また、GABP $\alpha$ は、TATAボックスを持たない遺伝子や、複数の転写開始点をもつ遺伝子の発現においてイニシエーターとして働くことができる (Yu M. J Biol Chem Nov 14; 272(46): 29060-7. 1997; Kamura T. J Biol Chem Apr 25; 272(17): 11361-8. 1997)。さらに、GABP $\alpha$ はその発現がユビキタスであるにも関わらず、他の部位に結合するパートナーの転写因子と相乗的に働くことにより、細胞特異的な分化・増殖に関与する遺伝子の発現を担う (Schaaffer L. EMBO J. Jun 1; 17(11): 3078-90. 1998)。

## 【0020】

GABP $\beta$ はEtsファミリーではないが、382アミノ酸を有するGABP $\alpha$ のコファクターであり、Ankyrinリピート配列を介しGABP $\alpha$ とヘテロ2量体を形成し、転写活性ドメインを有する。

## 【0021】

Ets1は、1983年に鶏に赤芽球症を起こすレトロウイルスE26の癌原遺伝子として発見されたv-etsのヒトホモログであり、441アミノ酸を有するタンパク質である。

## 【0022】

Telは、452アミノ酸を有するタンパク質であり、Etsファミリーの中でも、転写抑制に働くことが報告されている。臨床的には、t(12;21)の染色体転座によりAML1と癌合遺伝子を形成し、白血病を起こすことが知られている。

## 【0023】

Fli-1は、452アミノ酸からなり、t(11;22)染色体転座によりEWSと癌合遺伝子を形成し、ユーリング肉腫を起こすことが知られている。

## 【0024】

Ets ファミリーは、酵母からヒトまで保存されたEtsと呼ばれるドメインをもつ転写因子である。このドメインは、30種類以上のファミリーを形成し、その多くが分化・増殖・アポトーシスを担う分子の転写活性を担っている (D. K. Watson and A. Seth, Oncogene, review issue. Dec 18; 19(55); 2000)。

## 【0025】

プロモーター領域を得るには、シノビオリン遺伝子又はマウスやヒトゲノム配列等から、制限酵素を用いて切り出す方法がある。しかしながら、一般的に都合のよい制限酵素部位が適切な位置に存在するとは限らないため、予め制限酵素認識部位を設けたプライマーを用いることにより、PCRで所望のプロモーター領域を增幅することにより得ることができる。また、既に判明しているプロモーター領域の塩基配列情報をもとにして、所望のプロモーター領域を化学合成することも可能である。このようにして、転写因子結合部位と

してEBSの他にAML binding site(ABS)およびSpl binding site(SBS)の存在が示唆される。実際に転写因子がその部位に結合するかどうかは、それぞれの部位を変異させ、その転写活性が低下することや、ゲルシフトアッセイ(electrophoretic mobility shift assay: EMSA)で解析して、転写因子が元来のプローブには結合するが、一塩基変異導入後では結合しないことを確認することにより判断する。

#### 【0026】

ここで、配列番号1にマウスシノビオリン遺伝子の全長プロモーター配列を、配列番号2にヒトシノビオリン遺伝子の全長プロモーター配列を例示する。

#### 【0027】

また、配列番号8にEBSをコードする塩基配列を、配列番号9にABSをコードする塩基配列を、配列番号10にSBSをコードする塩基配列を示す。

#### 【0028】

### 2. デコイ核酸

本発明は、上記転写因子に結合し、プロモーター活性を抑制することができるデコイ核酸（デコイオリゴヌクレオチド）である。本発明のデコイ核酸は、転写因子の結合部位を含む短いおとり核酸を意味し、この核酸を細胞内に導入し、転写因子がこの核酸に結合することにより、転写因子の本来のゲノム結合部位への結合が競合的に阻害され、その結果、その転写因子の発現が抑制されるような機能を有する。代表的には、デコイ核酸は核酸又はその類似体であり、標的結合配列に結合しうる核酸配列を少なくとも一つ含む。

#### 【0029】

本発明の好ましいデコイ核酸の例は、例えばプロモーターのEBSに結合する転写因子と結合し得る核酸、プロモーターのABSに結合する転写因子と結合し得る核酸、プロモーターのSBSに結合する転写因子と結合し得る核酸、これらの相補体を含むオリゴヌクレオチド、これらの変異体、又はこれらを分子内に含む核酸などが挙げられる。デコイ核酸は、上記EBS、ABS又はSBSの配列をもとに、1本鎖、又はその相補鎖を含む2本鎖として設計することができる。長さは特に限定されるものではなく、15～60塩基、好ましくは20～30塩基である。

#### 【0030】

本発明においては、例えばEBSに結合する転写因子と結合し得る核酸（配列番号11）及び/又はその相補鎖（配列番号12）をデコイ核酸として好ましく使用することができる。

#### 【0031】

核酸は、DNAでもRNAでもよく、またはその核酸内に修飾された核酸及び/又は擬核酸を含んでいてもよい。またこれらの核酸、その変異体、又はこれらを分子内に含む核酸は、1本鎖又は2本鎖であってもよく、また環状でも線状でもよい。変異体とは、上記デコイ核酸配列の1又は数個（例えば1個～10個、1個～5個又は1個～2個等）の塩基が、欠失、置換又は付加された塩基配列からなり、かつ、シノビオリン遺伝子のプロモーター活性を阻害する機能、すなわち、転写因子と結合する機能を有する核酸をいう。上記塩基配列を1つまたはそれ以上含む核酸であってもよい。

#### 【0032】

本発明で用いられるデコイ核酸は、当業界で公知の化学合成法又は生化学的合成法を用いて製造することができる。例えば、遺伝子組換え技術として一般的に用いられるDNA合成装置を用いた核酸合成法を使用することができる。また、鋳型となる塩基配列を単離又は合成した後に、PCR法又はクローニングベクターを用いた遺伝子增幅法を使用することもできる。さらに、これらの方針により得られた核酸を、制限酵素等を用いて切断し、DNAリガーゼを用いて結合することにより所望の核酸を製造してもよい。さらに、細胞内でより安定なデコイ核酸を得るために、塩基等にアルキル化、アシリル化等の化学修飾を付加することができる。デコイ核酸の変異体の作製方法は、当業界で公知の方法を用いて、たとえば、部位特異的突然変異誘発法等によって合成することもできる。部位特異的突然変異誘発法は当分野において周知であり、市販のキット、例えばGeneTailor<sup>TM</sup> Site-Direct

ed Mutagenesis System（インビトロジエン社製）、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super Express Km等（タカラバイオ社製））を使用することができる。などを用いることができる。

#### 【0033】

デコイ核酸を使用した場合のプロモーターの転写活性の解析は、一般的に行なわれるルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、CATアッセイ等を採用することができる。これらのアッセイを行なうためのキットも市販されている（例えはpromega dual luciferase assay kit）。

#### 【0034】

例えはルシフェラーゼアッセイの場合は、目的遺伝子の転写開始点の上流にレポーターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結する。また、アッセイの対象となる細胞間の導入効率を補正するために、サイトメガロウイルス(CMV)βガラクトシダーゼ(β-gal)遺伝子をレポーターとしてプロモーターの下流につないだベクターを細胞に同時に導入してもよい。細胞への導入は、例えはリン酸カルシウム法等を採用することができる。ベクターを導入した細胞は所定時間培養した後に回収し、凍結一融解等によって細胞を破壊した後、一定量の細胞抽出液を用いてルシフェラーゼ及びβガラクトシダーゼ活性を測定する。

#### 【0035】

### 3. デコイ核酸を含む医薬組成物

本発明は、上記のデコイ核酸を1又はそれ以上含む、シノビオリン遺伝子の発現に起因する疾患を治療又は予防するための医薬組成物に関する。本発明のデコイ核酸は、標的結合配列への結合活性を有する限り、本発明の医薬組成物として用いられる。

#### 【0036】

本発明の医薬組成物の適用疾患としては、関節リウマチ、線維症、癌及び脳神経疾患などの細胞増殖性疾患及び/又は脳神経疾患が挙げられる。本発明の医薬組成物を疾患に適用するにあたり、上記疾患は単独の場合であっても複数の疾患が併発した場合であってもよい。

#### 【0037】

本発明の医薬組成物を癌の治療剤として使用する場合は、癌の種類は特に限定されず、脳腫瘍、舌癌、咽頭癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆道癌、胆囊癌、十二指腸癌、大腸癌、肝癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、皮膚癌、各種白血病（例えは急性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ性白血病、成人型T細胞白血病、悪性リンパ腫）等を対象として適用される。

#### 【0038】

上記癌は、原発巣であっても、転移したものであっても、他の疾患と併発したものであってもよい。

#### 【0039】

脳神経系疾患としては、例えはアルツハイマー、パーキンソン病、ボリグルタミン病が挙げられる。

#### 【0040】

本発明の医学的組成物は、デコイが患部の細胞内または目的とする組織の細胞内に取り込まれるような形態で用いられる。

#### 【0041】

本発明のデコイ核酸を含有する医薬組成物の投与形態は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。経口投与の場合は、適当な剤型、例えは錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁物により投与が可能である。非経口投与の場合は、経肺剤型（例えはネフライザーなどを用いたもの）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えは軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の場合は、例えは点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に直接的又は間接的に患部に投与することができる。

#### 【0042】

本発明の医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

#### 【0043】

また、本発明の医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。本発明の医薬組成物を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えれば静脈内、動脈内等から全身投与する。脳等に局所投与することもできる。本発明の医薬組成物を目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えはアデノエクスプレス：クローンテック社）を用いることもできる。リポソーム構造を形成するための脂質としては、リン脂質、コレステロール類や窒素脂質等が用いられるが、一般に、リン脂質が好適であり、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、カルジオリビン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチン等の天然リン脂質、あるいはこれらを定法に従って水素添加したものが挙げられる。また、ジセチルホスフェート、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイロホスファチジルコリン、ジパルミトイロホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイロホスファチジルセリン、エレオステアロイルホスファチジルコリン、エレオステアロイルホスファチジルエタノールアミン等の合成リン脂質を用いることができる。

#### 【0044】

リポソームの製造方法は、デコイが保持されるものであれば特に限定されるものではなく、慣用の方法、例えは、逆相蒸発法 (Szoka, Fら: Biochim. Biophys. Acta, Vol. 601 559 (1980))、エーテル注入法 (Deamer, D.W.: Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 308 250 (1978))、界面活性剤法 (Brunner, Jら: Biochim. Biophys. Acta, Vol. 455 322 (1976)) 等を用いて製造できる。

#### 【0045】

これらのリン脂質を含む脂質類は単独で用いることができるが、2種以上を併用することも可能である。このとき、エタノールアミンやコリン等の陽性基をもつ原子団を分子内に有するものを用いることにより、電気的に陰性のデコイ核酸の結合率を増加させることもできる。これらリポソーム形成時の主要リン脂質の他に一般にリポソーム形成用添加剤として知られるコレステロール類、ステアリルアミン、 $\alpha$ -トコフェロール等の添加剤を用いることもできる。このようにして得られるリポソームには、患部の細胞又は目的とする組織の細胞内への取り込みを促進するために、膜融合促進物質、例えは、センダイウイルス、不活化センダイウイルス、センダウイルスから精製された膜融合促進タンパク質、ポリエチレンゲルコール等を添加することができる。

#### 【0046】

本発明の医薬組成物は、常法にしたがって製剤化することができ、医薬的に許容されるキャリアーを含むものであってもよい。このようなキャリアーは添加物であってもよく、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

## 【0047】

上記添加物は、本発明の治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれる。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製されたデコイ核酸を溶剤(例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等)に溶解し、これにTween80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥用賦形剤としては、例えば以下のものが挙げられる。

## 【0048】

糖類：マンニトール、ブドウ糖、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトル等

デンプン：トウモロコシ、コムギ、イネ、ジャガイモまたは他の植物由来のデンプン

セルロース：メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はカルボキシメチルセルロースナトリウム等

ゴム：アラビアゴム、トラガカントゴム等

ゼラチン、コラーゲン等

所望により、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸又はその塩(例えば、アルギン酸ナトリウム)等の崩壊剤又は可溶化剤を使用することができる。

## 【0049】

本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なる。投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択する。有効投与量は、疾患の徵候又は状態を軽減するデコイ核酸の量である。このような核酸の治療効果及び毒性は、細胞培養又は実験動物における標準的な薬学的手順、例えばED50(集団の50%において治療的に有効な用量)、あるいはLD50(集団の50%に対して致死的である用量)によって決定され得る。

## 【0050】

治療効果と毒性効果との間の用量比は治療係数であり、ED50/LD50として表され得る。本発明の医薬組成物の投与量は、例えば1回につき体重1kgあたり $0.1\mu g \sim 100mg$ 、好ましくは $1 \sim 10\mu g$ である。但し、上記治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。アデノウイルスを投与する場合の投与量は、1日1回あたり $10^6 \sim 10^{13}$ 個程度であり、1週～8週間隔で投与される。但し、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

## 【0051】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

### 【実施例1】

## 【0052】

シノビオリンプロモーターの作製

### (1) プラスマミド構築

マウス(C57BL/6系)のゲノムより、シノビオリン遺伝子を含む5'から3'まで約7.5kbのゲノムをSyB/pBluescriptにサブクローニングした。その後、シノビオリン遺伝子のプロモーター領域をXbaIとNcoIで処理し、約3kの断片を抜き出し、PGV-B2(TOYO INK GROUP)の中に挿入した(SyG-2.2k)。この約3kの断片を全長プロモーターとした(配列番号1)。さらに、全長プロモーターの5'側から一部の領域を削除し、プロモーター領域を短くしたコンストラクトを作製した。作製したプロモーターをまとめると表1の通りである。

## 【0053】

## 【表 1】

表 1 作製したプロモーター一覧表（マウス）

名 称	領 域*	配列番号 1 に示す塩基 配列の領域
-2201/+843 (全長)	TS(転写開始点)を起点(+1)として上流(5'側)に 2201 塩基、下流(3'側)に 843 塩基の領域	1～3043
-1233/+843	TS を起点として上流に 1233 塩基、下流に 843 塩基の領域	969～3043
-1060/+843	TS を起点として上流に 1060 塩基、下流に 843 塩基の領域	1142～3043
-503/+843	TS を起点として上流に 503 塩基、下流に 843 塩 基の領域	1699～3043
-322/+843	TS を起点として上流に 322 塩基、下流に 843 塩 基の領域	1880～3043
-200/+843	TS を起点として上流に 200 塩基、下流に 843 塩 基の領域	2002～3043
-108/+843	TS を起点として上流に 108 塩基、下流に 843 塩 基の領域	2094～3043
-84/+843	TS を起点として上流に 84 塩基、下流に 843 塩 基の領域	2118～3043
-73/+843	TS を起点として上流に 73 塩基、下流に 843 塩 基の領域	2129～3043
-65/+843	TS を起点として上流に 65 塩基、下流に 843 塩 基の領域	2137～3043
-39/+843	TS を起点として上流に 39 塩基、下流に 843 塩 基の領域	2163～3043
-10/+843	TS を起点として上流に 10 塩基、下流に 843 塩 基の領域	2191～3043

\* 領域は、上流(5'側)に向かうときは TS (配列番号 1 の第 2201 番の t) の 1 個 5'側の塩基  
を -1 として数え、下流(3'側)に向かうときは TS を +1 として数える。

## 【0 0 5 4】

なお、ヒトのシノビオリン遺伝子の切断型プロモーターも、マウスの場合と同様に作成  
することができる（配列番号 2）。この場合の切断部位の位置を表 2 に示す。

## 【0 0 5 5】

## 【表2】

表2 作製したプロモーター一覧表(ヒト)

名 称	領 域*	配列番号2に示す塩基配列の領域
-2201/+892 (全長)	TS(転写開始点)を起点(+1)として上流(5'側)に2201 塩基、下流(3'側)に892 塩基の領域	1～3092
-1233/+892	TS を起点として上流に 1233 塩基、下流に 892 塩基の領域	969～3092
-1060/+892	TS を起点として上流に 1060 塩基、下流に 892 塩基の領域	1142～3092
-503/+892	TS を起点として上流に 503 塩基、下流に 892 塩基の領域	1699～3092
-322/+892	TS を起点として上流に 322 塩基、下流に 892 塩基の領域	1880～3092
-200/+892	TS を起点として上流に 200 塩基、下流に 892 塩基の領域	2002～3092
-108/+892	TS を起点として上流に 108 塩基、下流に 892 塩基の領域	2094～3092
-84/+892	TS を起点として上流に 84 塩基、下流に 892 塩基の領域	2118～3092
-73/+892	TS を起点として上流に 73 塩基、下流に 892 塩基の領域	2129～3092
-65/+892	TS を起点として上流に 65 塩基、下流に 892 塩基の領域	2137～3092
-39/+892	TS を起点として上流に 39 塩基、下流に 892 塩基の領域	2163～3092
-10/+892	TS を起点として上流に 10 塩基、下流に 892 塩基の領域	2191～3092

\* 領域は、上流(5'側)に向かうときは TS (配列番号 1 の第 2201 番の t) の 1 個 5'側の塩基を-1 として数え、下流(3'側)に向かうときは TS を+1 として数える。

## 【0056】

次に上記マウス由来プロモーターの変異体を作製するため、オーバーラップ伸長による部位特異的変異誘発法 (Molecular cloning, CSHL Press, 3 edition, 2001年, chapter 13 ) を用いて SyG-2.2kG-76T/BV2を作製した。使用したPrimerを以下に示す。

1. EBSm(G-76T) : GCGCCGGCGTAAGTGAGGT (配列番号 3 )
2. AMLm(G-68T) : AAGTGAGTTGTCTTACCCCC (配列番号 4 )
3. SP1m(G-92A, C-91A) : ACTCCGCCAACGCCCGCGCC (配列番号 5 )

PCRは、反応液50 μl中、1 pmol SyB/pBluescript、100 pmolプライマー、0.2 mM dNTPs 、5 Uポリメラーゼ、10 mM Tris-HCl (pH8.3) 及び50 mM KClを含む反応組成液を用いて、以下のPCR条件で行なった。

## 【0057】

### PCR条件

第一段階：94℃、1分→(94℃、30秒→55℃、30秒→72℃、1分) x 25回

第二段階：1サイクル目：94℃、1分→55℃、30秒→29分かけて30℃に落とす→30℃、1分→9分かけて72℃に→72℃、1分→(94℃、30秒→55℃、30秒→72℃、1分) x 25回

## 【0058】

EBSm(G-76T) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第2125番目 (TSから上流に向かって76番目(-76)) のGをTに変異させるためのプライマーであり、AMLm(G-68T) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第2133番目 (TSから上流に向かって68番目(-68)) のGをTに変異させるためのプライマーであり、SP1m(G-92A) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第2111番目 (TSから上流に向かって92番目(-92)) のGをAに変異させるためのプライマーであり、SP1m(G-92A, C-91A)は、配列番号 1 に示す塩基配列の第2112番目 (TSから-91番目) のCをAに、かつ、配列番号 1 に示す塩基配列の第2111番目 (TSから-92番目) のGをAに変異させるためのプライマーである。

## 【実施例2】

### 【0059】

#### シノビオリンプロモーターの機能解析

シノビオリンの量の調節機構を解明するために、プロモーター解析を行った。なお、シノビオリンは、トランスジェニックマウス (LacZ knock in) の解析、並びにノーザン及びウエスタンの結果よりユビキタスに発現していることがわかっている。

### 【0060】

まず、シノビオリン プロモーターのクローニング後、翻訳開始点より 2.2k を含む領域をルシフェラーゼベクターに結合させた。様々な細胞（下記）を用いて、上流側から削ったコンストラクションにてその転写活性を調べた。なお、細胞は、10% 不活化ウシ胎児血清添加DMEM培地 (Life Technologies, Inc.) を用いて培養した。

### 【0061】

#### 使用した細胞

ATDC5：マウス teratocarcinoma 細胞 AT805 由来の亜株。軟骨および色素細胞特異的。アルカリフィオスファターゼ陽性。

### 【0062】

#### HEK293：ヒト胎児腎臓由来細胞

#### NIH3T3：マウス胎仔由来線維芽細胞

トランスフェクションとレポーターアッセイは以下の通り行なった。

### 【0063】

細胞を  $2 \times 10^4/\text{well}$  にて 24well プレートに準備した。その 24 時間後、FUGENE 6 キットを使用し、キットのマニュアルに従ってトランスフェクションした (Biochem. Roche)。またトランスフェクション効率の補正のため、CMV- $\beta$ -gal を各 50ng 使用し、さらに全ベクターのみを入れて全量を 200ng にそろえた。

### 【0064】

トランスフェクション後 30 時間でタンパク質を回収した。まず、培地を捨てた後、PBS で洗い、Passive 溶解バッファー (Promega) を  $100 \mu\text{l}$  用いて細胞溶解物を回収した。次にその細胞溶解物の  $20 \mu\text{l}$  を 96well プレートに移した後、ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、 $\beta$ -gal 活性をプレートリーダーにて測定した後、 $\beta$ -gal 値で Luc 値を割り補正した。なお、 $\beta$ -gal 染色は以下の通り行なった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼは X-gal を用い、染色した (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド; Sigma)。胚を 4% パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、X-gal 溶液に浸した後、37°C で 12 時間～24 時間染色した。染色後、PBS で洗浄し、再度 4% パラホルムアルデヒドで固定した。

### 【0065】

その結果、-84 から -73 bp の 12 塩基においてその転写活性が 10 から 30% に低下した (図 1 A, B)。

### 【0066】

その領域を含む -114 から -1 においては、マウスとヒトで 94% の相同性をもち、さらに 12 塩基においては、100% の相同性を認めた。コンピュータを用いたバイオインフォマティクス解析ソフト (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) にて解析を行った結果、その 12 塩基に EBS (Ets 結合部位) が存在することが判明した (図 1C)。

### 【0067】

次に本発明者は、その領域を含む前後の領域における転写因子結合配列に変異を導入し、いくつかの Cell line を用いその部位の転写に及ぼす影響について検討した。

### 【0068】

図 1D にみられるように EBS (GBS ともいう) の点変異により、ほぼすべての Cell line にてその活性が約 9 から 40% 程度に低下した。これらのことから、この EBS は、シノビオリンの構成的発現を担う必須のエレメントであると考えられた。

## 【実施例3】

## 【0069】

EBS (-89から-65)につく転写因子の同定

Ets ファミリーは30種類以上のファミリーを形成し、すべてDNA結合ドメインであるEts ドメインを持っている。またその中心配列はGGAAであり、その配列への結合にはその配列に続く配列が重要であると考えられている。

## 【0070】

まず、その12塩基配列を含んだプローブを使用し、実際にその配列に転写因子が結合するかどうか検討した。この転写因子の結合試験は、ゲルシフトアッセイ(EMSA)を行った。

## 【0071】

EMSAは以下の通り行った。

## 【0072】

Probe

EBS WT; (-89から-65): CCCCCGGCGCCGCCGGAAAGTGT (配列番号6)

EBS MT; (-89から-65): CCCCCGGCGCCGCCGTAAAGTGT (配列番号7)

EMSA用のプローブは、25塩基配列のセンス鎖とアンチセンス鎖を90°Cで10分アニーリングさせることにより作製した。

## 【0073】

次に、T4 ヌクレアーゼキナーゼ、バッファーおよび $\gamma^{32}$ Pを混合し、混合液を室温で30分反応させた。反応液をMicro Spin G-25カラム(Amersham Pharmacia Biotech社)に通し、採取されたカラムのフラクションを遠心にて分離し、標識したプローブを得た。放射活性は1 $\mu$ lあたり30000cpm以上のものを使用した。

## 【0074】

10 $\mu$ gのタンパク質、反応バッファー及びプローブを混ぜ、室温で30分反応させた。スーパーシフトの場合は、プローブと反応させる前に1時間4°Cで反応させた。その反応液を非変性ゲルにて100v、50mAで3時間程度泳動させた。ゲルを乾燥させた後、Fuji BAS2000を用いオートラジオグラフィーにて解析した。

## 【0075】

その結果、NIH3T3の核抽出液を使用したゲルシフトにより、4つのバンド(図2Aのa、b、c、dの位置のバンド)が形成されることが判明した。さらにcold competition(標識していないプローブを用いた競合試験)により、そのすべてのバンドが消失し、1塩基変異を入れたプローブにおいてはその阻害が見られなかった(図2A)。

## 【0076】

次に、どのEts ファミリーが結合するかを検討するため、Ets1/Pea3、Ets プローブのcold competitionを行ったところ、ets1/pea3のプローブで競合阻害され、その変異によりその阻害が消失した(図2B、5と6番のレーン)。

## 【0077】

このことは、Ets1/Pea3 プローブ(Santa Cruz社より購入)に結合する因子であるEts 1、Pea3、GABP $\alpha$ 等の転写因子である可能性が考えられた。さらにさまざまな抗体を使用して、スーパーシフト試験を行ったところ、GABP $\alpha$ とTcf1がスーパーシフトし、Fli-1は阻害効果を示した(図2Bの5、6番のレーン、図2Cの6、7、8と10、11、12番のレーン)。また、GABP $\alpha$ 、Fli-1、ets1のin vitro 翻訳産物でゲルシフト試験を行ったところ、そのすべてにスーパーシフトが見られた。これらのことから、この配列には複数のEts ファミリーが結合することが示された。

## 【0078】

次に、スーパーシフトしたGABP $\alpha$ によるGABP $\beta$ との複合体形成について検討を行なった。それぞれin vitro翻訳産物を用い、ゲルシフト試験を行ったところ、GABP $\alpha$ タンパク質にGABP $\beta$ タンパク質を加えたレーン7において、新たなバンドa、b(複合体)の形成が認められた(図2D)。さらに、GABP $\alpha$ 抗体を加えるとその複合体a、bが消失しスーパーシフ

トした（図2D、レーン8、9）。またGABP $\alpha$ 抗体を加えたところ、複合体 $\alpha$ の形成が阻害された（図2D、レーン10、11）。

#### 【0079】

これらのことから、GABP $\alpha/\beta$ は、シノビオリンプロモーターのEBSにて複合体を形成することがわかった（図2D）。

#### 【実施例4】

#### 【0080】

NIH3T3におけるEtsファミリーによる転写制御およびGABP $\alpha$ とFli-1、Ets1のシノビオリン転写活性に対する効果

それぞれEBSに結合する転写因子の細胞内でのシノビオリンの転写活性化能を評価するため、転写活性化アッセイを行った。

#### 【0081】

##### (1) ODNのオリゴ作製と細胞抽出液の作製

20ヌクレオチド長のオリゴデオキシリボヌクレオチド(ODN)は化学合成により得た。decoy(デコイ)ODNはセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドのアニーリングにより作製した。対数増殖期の細胞をトリプシン処理し、96-wellプレート( $1 \times 10^3$ 個/well)に移した。24時間後、1ウェルあたり20pmolのデコイODNをウェルに入れ、LipofectAMINE(Invitrogen, San Diego, CA)を用いてキットの説明書に従って3日間トランスクエクションを行った。デコイODNを有する細胞の増殖を決定するために、Alamar Blue(Biosource International)を用いて、キットの説明書に従って細胞増殖アッセイを行った。

#### 【0082】

##### (2) RNAiのオリゴ作製と細胞抽出液の作製

21ヌクレオチド長のRNAは化学合成により得た。siRNAはElbashir et al (2001)のプロトコール(Elbashir, S.M., Nature 411: 494-498, 2001)に従って作製した。対数増殖期の細胞をトリプシン処理し、96-wellプレート( $1 \times 10^3$ 個/well)に移した。24時間後、1ウェルあたり20pmolのsiRNAをウェルに入れ、LipofectAMINE(Invitrogen, San Diego, CA)を用いてキットの説明書に従って3日間トランスクエクションを行った。siRNA細胞の増殖を決定するために、Alamar Blue(Biosource International)を用いて、キットの説明書に従って細胞増殖アッセイを行った。

##### (3) 結果

NIH3T3において、Fli-1はシノビオリン転写活性を抑制し、GABP $\alpha$ はその転写活性を増加させる結果が得られた（図3A、B）。また、GABP $\alpha$ 、GABP $\beta$ のRNAiにてノックアウトしたNIH3T3細胞では、シノビオリンの転写も低下が認められた（図3C）。これらのことからNIH3T3において、GABP $\alpha/\beta$ 複合体がシノビオリンの発現を担っていることが考えられた。

#### 【0083】

さらに、そのGABP $\alpha/\beta$ 複合体がEBSを介してシノビオリンの転写活性を担っていることを証明するため、EBS(G-76T)変異体およびEBS wildをもつプロモーター(-200から+843)を使用し転写活性アッセイを行った。

#### 【0084】

その結果、変異体が全く活性化されないにもかかわらず、野生型では約3倍の転写活性化がみられた。

##### (4) ウエスタンブロッティング

最後にNIH3T3を200nMのデコイで処理した後、シノビオリンの発現をウエスタンブロッティングにて評価した。

#### 【0085】

ウエスタンプロット解析は以下の通り行った。すなわち、細胞培養物を回収し、1%NP-40, 25mM Tris-HCl, pH6.8, 0.25%SDS, 0.05%2-mercaptoethanol and 0.1% glycerolを含む溶液中で溶解させた。透明な細胞溶解物のアリコートをSDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離した。分離したタンパク質をニトロセルロース膜に移し、抗シノビオリンモノクロ

ーナル抗体を用いてイムノプロットを行った。結合した抗体を、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン及びECL 検出システム(Amersham Pharmacia Biotech)により検出した。

#### 【0086】

その結果、EBS野生型で処理したシノビオリンの発現は約半分に低下した。

#### 【0087】

これらのデータからGABP $\alpha/\beta$ によりEBSを介して、シノビオリンの転写が制御されていることが示された。

#### 【実施例5】

#### 【0088】

マウス胚におけるシノビオリンの発現に必須の部位の同定

次に、マウスの胚において $in vivo$ におけるEBSの効果を確認するため、シノビオリンプロモーターにLacZを結合したプラスミドを過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。 $T_g$ は全長3kと1kのプロモーターとそれぞれ1塙基変異を入れたプロモーターを過剰発現させた4種類を作製した(図4A)。

#### 【0089】

トランスジェニック( $T_g$ )マウス用のコンストラクションと $T_g$ マウスの作製は以下の通り行なった。

#### 【0090】

SyG-2.2k/BV2からNotIとNcoIで約3kの断片を抜き出した後、SyTB/pbsへ挿入し、SyL-2.2kwt/pbsを作製した。さらに、SyL-2.2kmG-76T/pbs、SyL-200wt/pbs及びSyL-200mG-76T/pbsを、それぞれSyGより取り出した断片を用いて作製した。各構築物について、それぞれQIAGEN Plasmid Kit (QIAGEN)を使用し精製後、ScaIにて線状化したDNAをBDFマウス(C57BL/6NとDBA/2Nの交配による仔マウス)の受精卵の核内に直接マイクロインジェクションし、仮親の卵管に移植した。それぞれ、8から9母胎より誕生したマウスの尾からゲノムを抽出し、サザンプロット法にて $T_g$ マウスであることの確認を行った。

#### 【0091】

これらの $T_g$ マウスからシノビオリンの発現を検討するため、胚によるX-gal染色を行った。そのLacZをノックインしたノックアウトマウスの胚におけるLacZの発現と今回作製した4つの $T_g$ マウスの発現を比較検討した。

#### 【0092】

シノビオリンの11.5から14.5 d. p. c (days post coitus: 胎齢)の胚を使用し、LacZ染色を行った。3kと1kのプロモーターを導入したトランスジェニックマウスは、ヘテロノックアウトマウスとほぼ同じ部位に染色がみられた。驚いたことに、1塙基変異を導入した3kと1kのプロモーターを導入したトランスジェニックマウスは、そのどちらも発現部位がその系によりランダムになることが確認された(図4B)。

#### 【0093】

転写活性化に必要な領域がなくなると、上記結果と同様の結果が得られることが報告されている(pax5, colla2等)。これらのことから、EBSは、シノビオリンの転写に必須の部位であることが判明した。

#### 【0094】

さらに、その発現とGABP $\alpha$ の発現を13.5 d. p. cの胚を用いて比較したところ、ほぼ同様の部位に発現していることが判明した(図4C)。以上の結果より、胚発生においても、 $in vitro$ の結果と同様、GABP $\alpha$ がEBSを介してシノビオリンの発現を制御していることが示された。

#### 【実施例6】

#### 【0095】

RA滑膜細胞におけるシノビオリンの発現抑制の確認

リウマチの滑膜細胞におけるEBSを介したGABP $\alpha$ の効果について検討を行ったところ、滑膜細胞の核抽出液を用いたゲルシフトにおいても、NIH3T3の各抽出液のときと同様にGA

$\text{BP}\alpha$ にてスーパーシフトが得られた。さらにそのEBSのリウマチ滑膜細胞における意義、すなわちGABP $\alpha$ によるEBSを介した転写制御がシノビオリンの発現抑制につながり、最終的に滑膜細胞の増殖抑制となるかことを確認するため、EBSデコイによるシノビオリンの発現抑制について検討した。

#### 【0096】

まず、上記のEBSに結合するGABP $\alpha$ と結合するデコイ核酸（配列番号11、12）およびネガティブコントロールのデコイ核酸配列（配列番号13、14）も設計した（図5）。20ヌクレオチド長のODNは化学合成により得た。デコイODNはセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドのアニーリングにより作製した。

#### 【0097】

以下のように、デコイ核酸を細胞に導入した。すなわち、対数増殖期のヒトリウマチ滑膜細胞をトリプシン処理し、10%FCSを含むDMEMにて96 wellプレートに $1.0 \times 10^3$  cells/wellで培養した。18~24時間後、FCS free、抗生物質無しのDMEMで一度洗浄し、FCS free、抗生物質無しのDMEM 90  $\mu\text{L}$ を添加した。OPTI-MEM I Reduced-Serum Medium 45  $\mu\text{L}$ 、上記のデコイODN (20  $\mu\text{M}$ ) 5  $\mu\text{L}$ を混ぜたものをOPTI-MEM I Reduced-Serum Medium 50  $\mu\text{L}$ 、Lipofectamine 2000 1  $\mu\text{L}$ を混ぜたものに加え、弱くピペッティングした後10分間放置した。これを細胞に10  $\mu\text{L}$ ずつ満遍なく添加した。24時間培養後、FCSを10  $\mu\text{L}$ 加え、軽くかき混ぜて放置することにより3日間のトランスフェクションを行った（図6）。この細胞を用いてキットの説明書に従って細胞増殖アッセイに供した。

#### 【0098】

HRP活性の検出にはECL Plusキット（Amersham社）を用いた。

#### 【0099】

その結果、約半分にその発現の低下が認められた（図7A）。

#### 【0100】

上記の細胞を24時間培養後、WST-8アッセイに供するとともに、この24時間後細胞破碎液にて細胞を溶解し、Western blottingを行った。WST-8アッセイはCell Counting Kit-8 (Dojindo)を用いて上記24時間培養後の細胞にCell Counting Kit-8 (Dojindo, WST-8)を添加し、4時間後の吸光度(450nm)を測定することにより行った。Western blottingは、細胞破碎液15 mM Tris (pH 7.5)、200 mM NaCl、0.5% NP40、0.1% SDS、1 mM PMSF、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pepstatinにて調製後、SDS-PAGEにより分離し、エレクトロプロッティング法によりニトロセルロース(NC)膜に転写した。このNC膜に対し、5%スキムミルクを加えた0.03%Tween 20添加TBSで室温、1時間ブロッキングした後、抗シノビオリン抗体又は抗 $\beta$ アクチン抗体を0.5%スキムミルクを加えた0.03%Tween 20添加TBSで室温、1時間免疫反応させた。反応後のNC膜を0.03%Tween 20/TBSで洗浄し、HRP標識抗ウサギIgG抗体を2次抗体として、室温、1時間免疫反応させ、0.03%Tween 20/TBSで洗浄し、HRP活性を検出することにより目的抗原を検出した。

#### 【0101】

WST-8アッセイの結果を図7Bに、Western blottingの結果を図7Cに示す。図7Bに示すとおり、スクランブルデコイ核酸導入細胞（ネガティブコントロール）に比べ、EBSデコイ核酸導入細胞では優位に細胞増殖活性が抑制されており、図7Cに見られるとおり、Western blottingにおいてもシノビオリンタンパク質生成量の減少が見られた。

#### 【0102】

以上の結果から、RA滑膜細胞において、上記デコイ核酸を用いるとプロモーター活性が抑制されることが示された。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0103】

【図1A】切断型シノビオリンプロモーターの活性を示す図。

【図1B】切断型シノビオリンプロモーターの活性を示す図。

【図1C】シノビオリンプロモーターのEts結合部位及びコア領域を示す図。

【図1D】プロモーターに変異を導入したときの転写活性を示す図。

- 【図 2 A】 ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真。
- 【図 2 B】 ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真。
- 【図 2 C】 ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真。
- 【図 2 D】 ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真。
- 【図 3 A】 シノビオリンプロモーターの転写活性を示す図。
- 【図 3 B】 シノビオリンプロモーターの転写活性を示す図。
- 【図 3 C】 RNAiを利用してノックアウトしたNIH3T3細胞におけるシノビオリンプロモーターの転写活性を示す図。
- 【図 4 A】 3kと1kのシノビオリンプロモーターにLacZを結合したプラスミドの構築図。
- 【図 4 B】 マウス胚におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真。
- 【図 4 C】 マウス胚におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真。
- 【図 5】 デコイ核酸の配列を示す図。
- 【図 6】 滑膜細胞中のシノビオリンの発現抑制確認試験のタイムスケジュールを示す図。
- 【図 7 A】 RA滑膜細胞におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真。
- 【図 7 B】 滑膜細胞中のシノビオリンの発現抑制を測定したWST-8アッセイの結果を示す図。
- 【図 7 C】 滑膜細胞中のシノビオリンの発現をwestern blottingで確認した結果を示す写真。

【配列表フリーテキスト】

【0 1 0 4】

配列番号3：合成DNA

配列番号4：合成DNA

配列番号5：合成DNA

配列番号6：合成DNA

配列番号7：合成DNA

配列番号1 1：合成DNA

配列番号1 2：合成DNA

配列番号1 3：合成DNA

配列番号1 4：合成DNA

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> locomogene

<120> Decoy nucleic acid against syobiolin promoter

<130> P04-038

<160> 14

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 3046

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

gcaagagacc ttatTTTgtt tttcgagaca gggTTTctct gtgttagccct ggctgtccta 60

gaactcacTC tgttagaccAG gCTggcCTcg aactcagaaa tccgcctGCC tctgcctccc 120

gagtgcTggg attaaaggta ggCGGCCacca cGCCcagctt tttttttt agataggatc 180

tcaCTctata gctgtacgct ggcctcagat ttatgatgct ctTCCTGcct cagtcTccc 240

atTTTctggg atttgtaggag tggGCCacta tgctctgctc actacatgat ttcaGAGGTT 300

gagtagacCT gaactgaaga ccagacaagg gagCCCTccc tcgacatctt gggGCCAGGG 360

aagtTgaAGC cataggatca gagggAAATgt ggcaAGaaaa aaggCCAACA tggacacaga 420

acTTAAATAA aaACAGACAG aggaAGTAAG acAGATATAT acCTggggGA gaggaggat 480

TGCCACAAAA tgttaggAGAT tttcaAGAAT gggggaggat gagTGTGTAG gttAAAGGT 540

agCCAGTAGA agttcatAGC tagCCTTATg gaggaAGGAA aggggAGCCA tCTCGGGATg 600

ttaACTGTtA aagacaACAG gtggTggTGA agatggcTGA gaccaAGAGC acaggGcTGA 660

ggggcagaca ggcactgaca ctgctaccct ttaatacagt tcctcctgtt gtgatccccca 720

accataATTA ctTCGTTGCT acttcataAC tGTAATTtTG ctAGTTATGA attgtAAGTA 780

aacgtCTGAT atgcaggATA tctcatTTGT gACCCCTGTG taacggTTG attcccaaAG 840

ggcttaCGAC tcacaggTTG agagCCAGCC actgcCTTAA agtCGTCTAG aatcAGTTT 900

ctttctttt tgacagacAA gatgttaAT tccgttgac tgaaggAAAG ccattttatg 960

tat ttttctt aagt gctcta tcagtaatga caattctgaa agcccccgttg ttatat tttta 1020  
acaacacagt caccccggt tctgtattca ctgtccgtgt tgtgactccc acagtataaa 1080  
ttcctccagt tgatcttcat gaattcttat atttgatccc cccccccctt aggccctctga 1140  
attccgagtg agtccgagtt aaaaatggga ggagcacccct cttagctgata aacctggta 1200  
atgagggtgtc cgctttcagt ttccattctg tacgcaacta tactgcttgt gtgagcccta 1260  
acagacagaa tcagctcaga acaaagggtc tggctatctc ccagggatga acacgcacgc 1320  
cgactgagct tttgggtgt tgaaaagtca acgccttcgc acagaactct ccaccccaac 1380  
ctagaaataa ctggcggttct gtttatgtc agtccggaca cgcaagcact gctcctttt 1440  
cgggccccgt aagcateccc ccagggcgga tagggatccc cggcctatgg actgchgctt 1500  
ctcagctggc atccagctgc cttggcaccc agtccggggc cactctgcct acagacccta 1560  
gcaaccactc acctgctttt ctcccttat agggcagaaa ttttcctttt ctccctcat 1620  
tggtcccggt aacttatacg caaccaatcg gcggtacacg ggaacaaact cactcctaca 1680  
caacctgcgt tgggggagg taacctggga agacctataat ctgtttctg caccgctatt 1740  
ttttccgag aagcacttaa cttcttaccg tgtcgtagct atccctggaa tgaggcgctt 1800  
acacat tttta ttttttcat gcctgacata aagtctggcc ctgcgtcgct cctggccccc 1860  
gtccaaatgg ctggccccgc ggaacgcca tttccaggc acattgagag ccggaggttt 1920  
ggagggagtt tagggtggtg attctacaac ggcaacttagc aagtggcggt cttcagccct 1980  
ttcccgctgc tctcctggtc gcgaccacac gtcacagctc tcgctcggtc cggttgcgtc 2040  
cgcagggggt gggaggtgtt gttAACCGGA gcggctgccc cagtcgcccgt gattgagcgt 2100  
actccggccgc gccccggcgc gccggaaatg aggtgtctta ccccccgaagt tccggttcgc 2160  
aggggggtggg gagtggtgtt aaccggagcg gctgcccgcag tcgcccgtat tgagcgtgct 2220  
cgccggcgctg ggctccctgggt gagtgcccgt ggtcctgatt ggggttgggg ggtcggcggtc 2280  
taggaccttg tccttgggg tcactgcaat cagccccccc cgctgcgttc ggccggccagt 2340  
ttcggccctg tcagatggct ggagacctta ggccggcgccg cggccacccgt tccagaggcc 2400  
ggccccggcc tgcgaggttc gcaactccta gcgttccacag gtgcgcgact gtgaggcgac 2460

ctgactggtt	ctcagccccg	ccgcccgcacc	ctggcggtcg	gccgttctc	cggttctcag	2520
agtggacact	gctgggggchg	gggggggggg	cagggttcca	gactgacgta	cccccgtatggg	2580
cgcgcgtctg	cgctgaccac	cctggcacag	ctgtcaactgg	tttgtgtcgcc	ttctcaagct	2640
gtgcccctctg	cacccctgcct	cctccacccc	tggcgggccc	agcgaacctg	cctctaagc	2700
ctatcatccc	agctccttca	gagggtcagc	ggtggcagcc	cccctctcc	taactttgcc	2760
tcaagtgactc	cctagaggag	gcgccttggc	agacagcgtg	gaagagccct	agatttgaaa	2820
c gagattgat	ccaagttcta	ggccttgcata	cagtgtgagc	ctctaacc	tttgagtcct	2880
agtttctcgt	tttgtaaaca	gggagtatat	gctgtttga	atctaattggc	tgtcaagg	2940
aatgagtgt	ttggccttac	actctgccag	ggactgtgct	aggtttacat	agtgtggata	3000
tacaaaatgt	catttcctt	gtgcaggtct	ctggggccagg	gcgatg		3046

<210> 2  
<211> 3092  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 2							
ttggctcata	acctcacttc	ctttaagtct	ttgctcaa	atgtcac	tttcaaggaa	60	
tacccgat	tttgcgtt	tttgcgtt	tttgcgtt	tttgcgtt	tttgcgtt	120	
cccttattct	gttctacttt	tttccatag	cactgatcat	cttccagcgt	attagat	180	
tca	ttatgt	ctgtggttt	ctgtcacatc	tactaggata	agctccacaa	240	
ctttat	tttgcgtt	tttgcgtt	tttgcgtt	tttgcgtt	tttgcgtt	300	
tagacta	act	gaataaaatga	cttaattacc	agtttggatg	tggggcaga	tagttagcat	360
gatgcccgtt	tccggagctg	gggtgcagac	agtgtctagg	gacactgaac	tgtttaaaaa	420	
gcaggataga	tcccggtgg	agaccacaca	aggaaatcat	cagcacctgg	gtcaggggct	480	
ggactggagc	agaggaaatc	atgcaggaaa	agtaaagaga	aggacatcag	gtaaagagaa	540	
gaggacacat	gcata	ggccat	ggaggcagagg	catgtggatc	acagaagctt	600	
aggaggaga	cttcaagaa	ggggagagag	gtttagtcaa	gcaagggtcg	aaagccaacc	660	

atggatgca gtcactagaa agttacagat aggcaagggtg ttgtggctca cgccctgtaat 720  
cccaaacacct tgtggggctg aggtgggagg atcgctttag cccgggaggt cgaggctgca 780  
atgagccctg atggcgccaa tgcactccag cctggcgac agagcaagac cctgtcgcaa 840  
aaattaataa ataaataaat aaaaagaaaa gggggaaaaa aagttatacgtggccttacg 900  
ggaagccaa ctctgactgg ttataagctg aaactgtcaa gtcaacaggt ggcaggaaag 960  
atggctgaga ccaacagcac agagatttag aggtagacag acctggcgcc aatccttagga 1020  
caggttttgg taagcctttg aatttcaatt gccccacgtt tcgggggagg gggtagcacc 1080  
ccctagctca taaaccttag tgattgatgtttaaatgaga tgacggagga aaacgcaagg 1140  
cacaaagtgg atgcatttagc tccattttgt taatcagcag gcttagttgg ctgcgacc 1200  
gacacgaact aaaatacagt gcagccccagg accagtgggg gtcttgctta tggctcagag 1260  
ctgaacaaca catggcagc aaaatcagac actgagatgc gggcaggcct gcgacgctga 1320  
agtcaattcc ttgtAACAAA cagaacactt ccgtccccaa attagcagga attaatctcc 1380  
cagtcctcggt tacacctggt tgtccctccc tgtcctggcg cggcaaacgt tccggaggc 1440  
cagccagggta cactcgccc aaggactgag cttccctac tctcagccaa ctggagcggg 1500  
accagggcct aggcaacgca gctgtccgccc cctaacaacc actcacctgc tttccccctt 1560  
ctataggcca gcaaaggtaatatttttc ttattggcc gcttaactta tcgcaaccaa 1620  
tcagtgccag ccacgggacc caactcactc ccacacaact tgtgggggtg atcatggaga 1680  
agacaaattt ttgtttccg catccagttc tctcagagag caccgtatTT gtcaaactgt 1740  
tgtgactctc cctaaatgtt taagaaaaca tttcattccc ctcaaggcttg tatagtctgt 1800  
ccctggccta ctccccgctc caggtggtaac agcccgcaag cggctccct tccagctgc 1860  
tcgcggggcc gagtccccca gtccgaggag gccactcagc gcaggagcca taccatctgt 1920  
gactaataaa taataggggg acctccgact ccccccgtt gccttattac cttccgacca 1980  
cctctcgac ctcttgcaca gcccctcccc gtagacatca ccccagatac ggtggtgaca 2040  
ccattgctat ggccccacgt agggcgcagt gcgagccagg gcaggacgca cttggtaacg 2100  
cccacggcgc gccccggcgc gccggaaagt aggtgtctga ccccccgaagt tccggttcgc 2160

agggggtggg gagtgttgtt aaccggaggg gcagccgcag tcgcgcggat tgagcggct	2220
cgcggcgctg gtttcctggt gagtgcccccg aagtctggcc cgagttgtgg ttgggtcgg	2280
gaccgaacc ttcccattga ggtctccgga gtccggcacgc ccctcagccc cgccgcacgc	2340
tttcggcctg tcagctggcc ggagaccta gacgcccgtg cggccgcattt gctcaagcct	2400
ggccctgcc tgcgacgccc gcaactcctg gtgctcacag gtgcgcggcc gcgaggcga	2460
ccggctct cccgtccccgc tgctgctctc tcccgtccccg ctgttttgt ggtgctctga	2520
gttgacacta ctccgggggt cgggggaccc caggattcca ggctgacgtt ccccgccccgc	2580
tcccgcaggc cggcggtccg aactgcccac cctaacaacag ctgtcacccgg cgctgtcgcc	2640
tccccagcct gctatcctct gtgccttggc tgctctcagc cctggctgctgcat tccggcc	2700
cctggagcag atttctgctg ttgcctccca ccccatcttc tccaccggag ggtcagcgggt	2760
gcagctcccc ctccctccaaac attgcagctt ttccatcatca cctccctaga ggaggcggct	2820
tggcaggcag cgtggaaaga gccctagatt tgaagcaaga ctgacccagg ttccaggcct	2880
tgcgtcagtg tgatcaactta accccattcga gtctaatttg taaaatgggg tagcgtaa	2940
tattctttgt ctgatgatatt cgagggcgaa atgtgatttc ccccccaccc tctccatatga	3000
attgaggctg tgccaggcac cgggctatcc tgcacagcac gagcatcaca taagttat	3060
tcttgccccca tgcaggctcc cgggcccagg ca	3092

<210> 3  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

<400> 3  
gcgcgcgcgt aagttaggt 19

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 4

a a g t g a g t t g t c t t a c c c c

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 5

a c t c c g c c a a g c c c c g c g c c

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 6

c c c c g c g c c g c c g g a a g t g t

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 7

c c c c g c g c c g c c g t a a g t g t

20

<210> 8

<211> 11

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

g c c g g a a g t g a

11

<210> 9  
<211> 6  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
t g a g g t 6

<210> 10  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 10  
g c c g c g c c c c 10

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

<400> 11  
g c g c c g c c g g a a g t g a g g t g 20

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

<400> 12  
c a c t c a c t t c c g g c g g c g c 20

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 13

ttgcgtacc ctacttagcc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

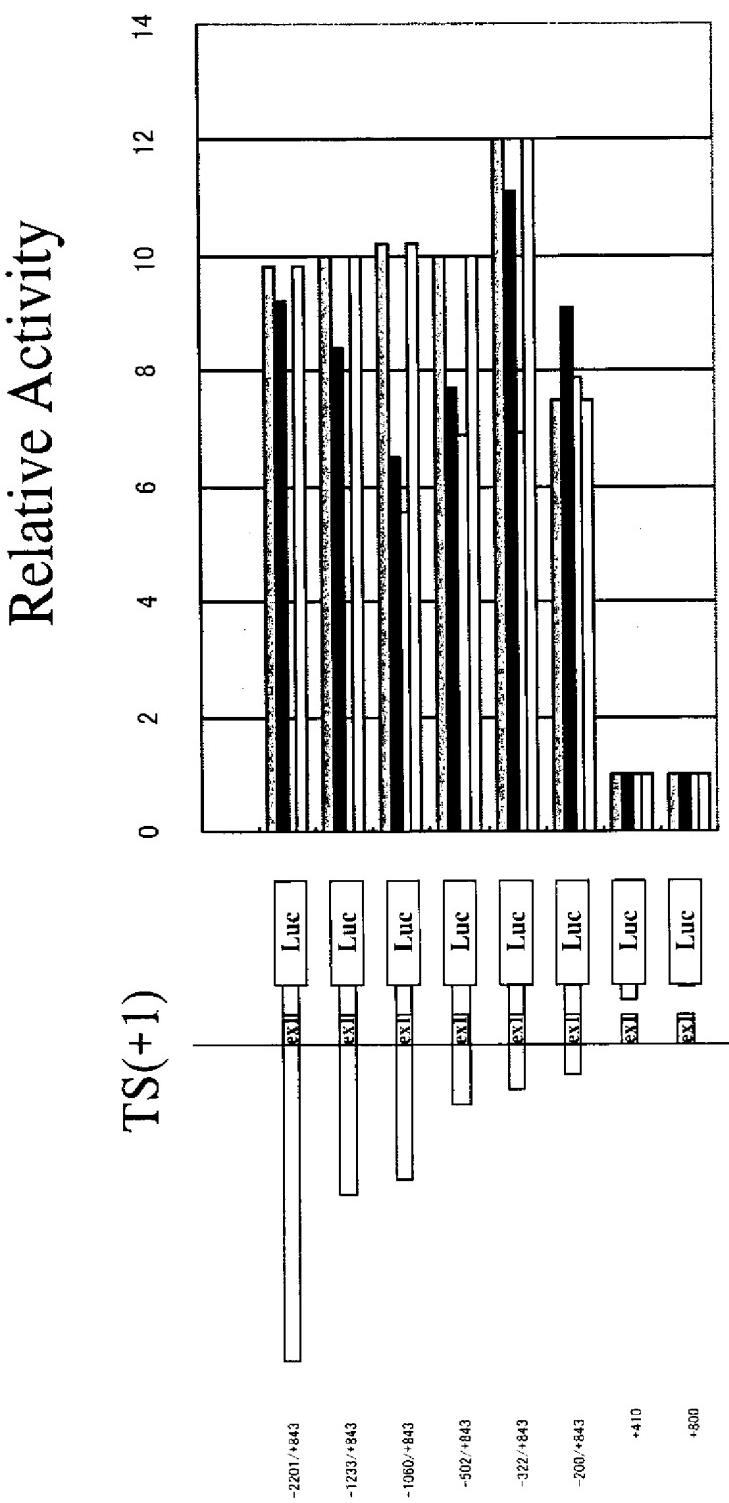
<400> 14

gctaagtag ggtagggcaa

20

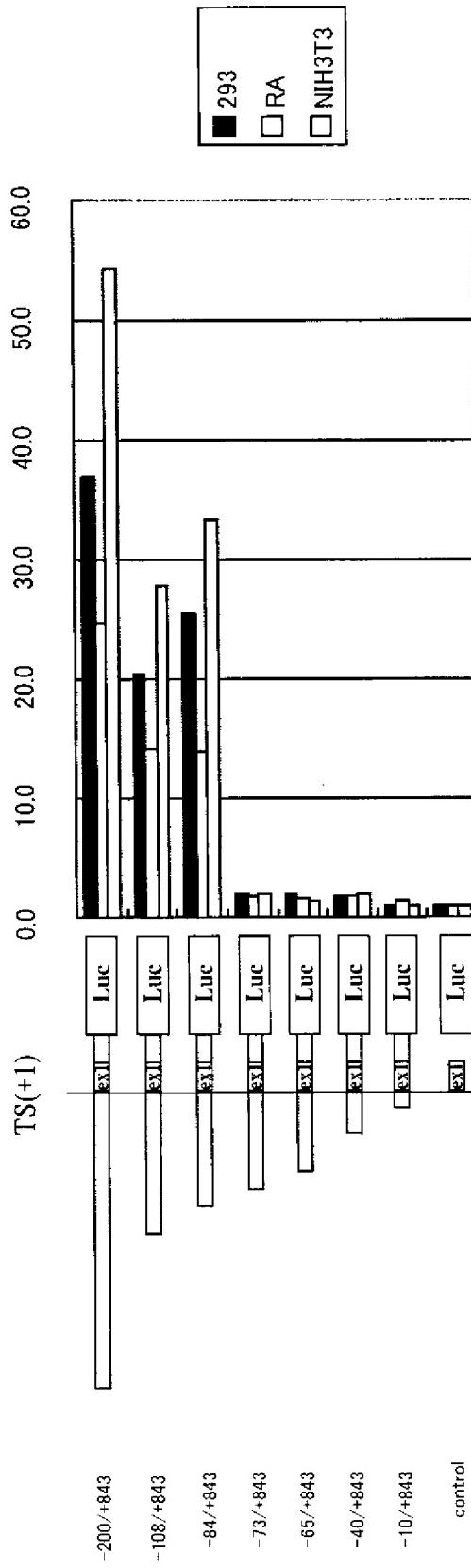
【書類名】図面

【図 1 A】

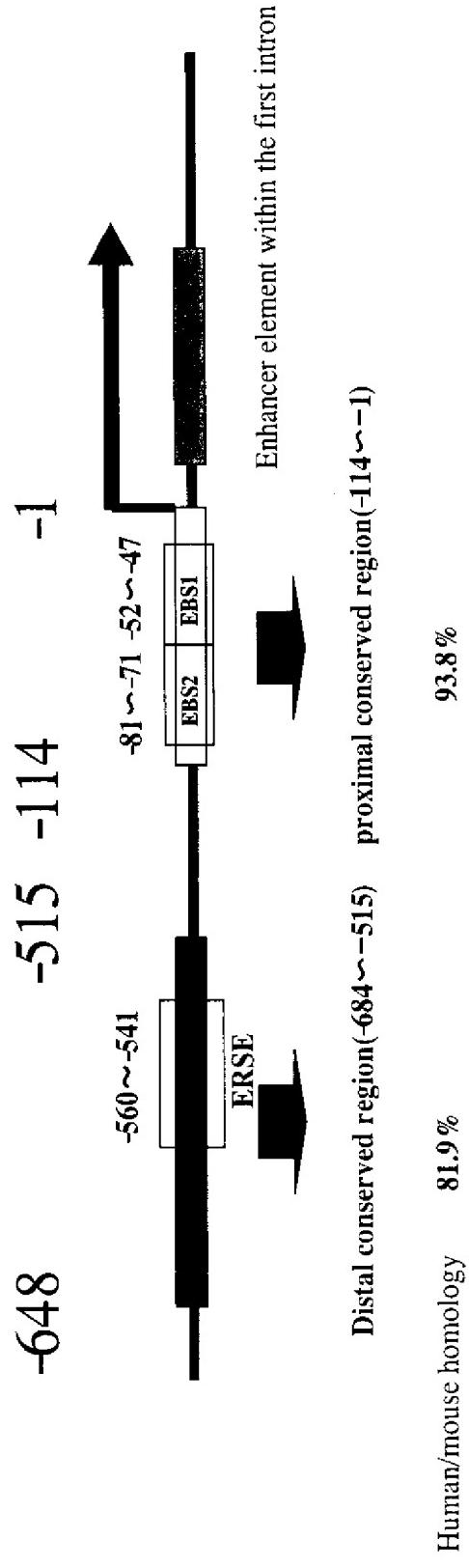


【図 1 B】

## Relative Activity



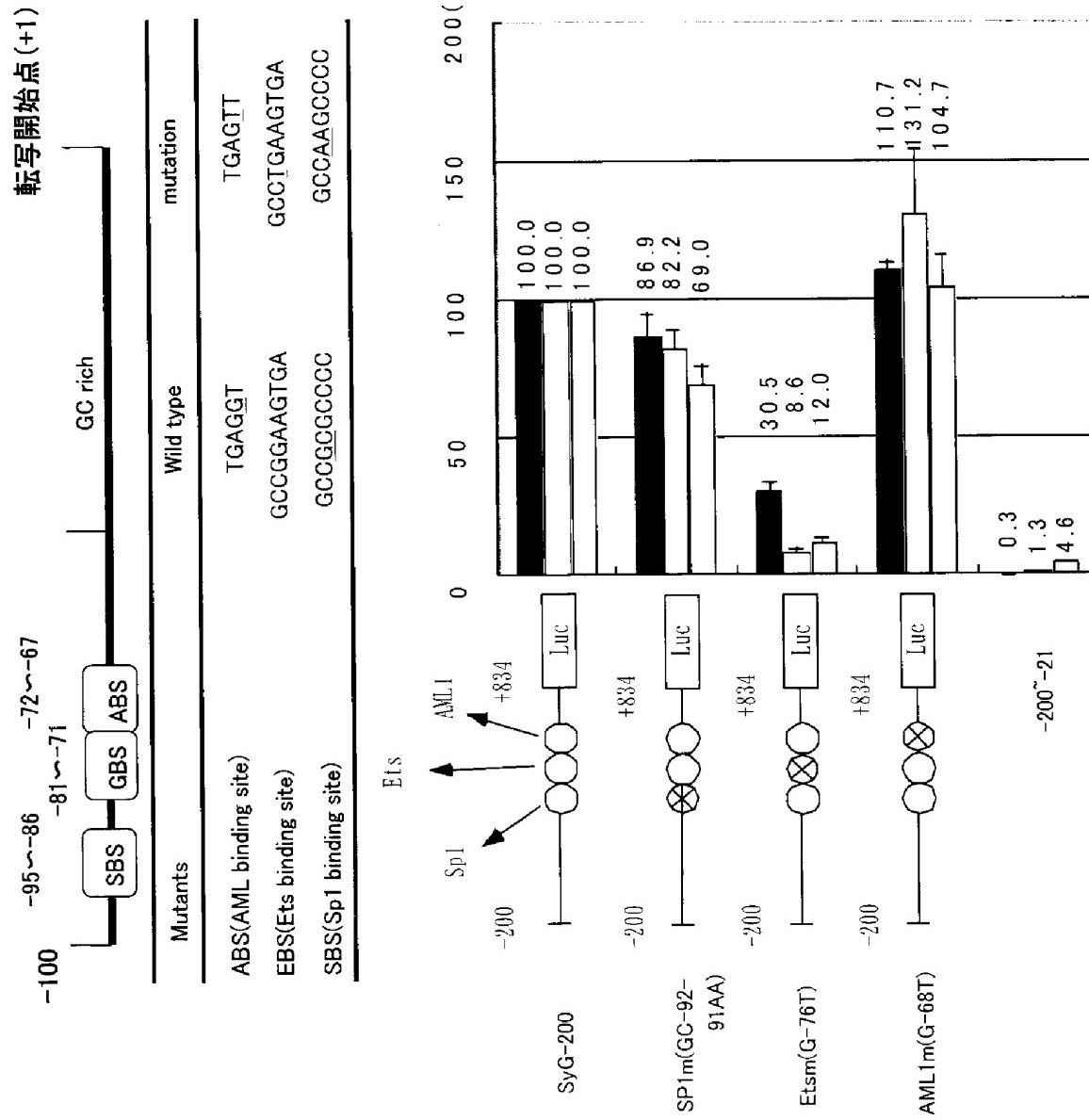
【図 1 C】



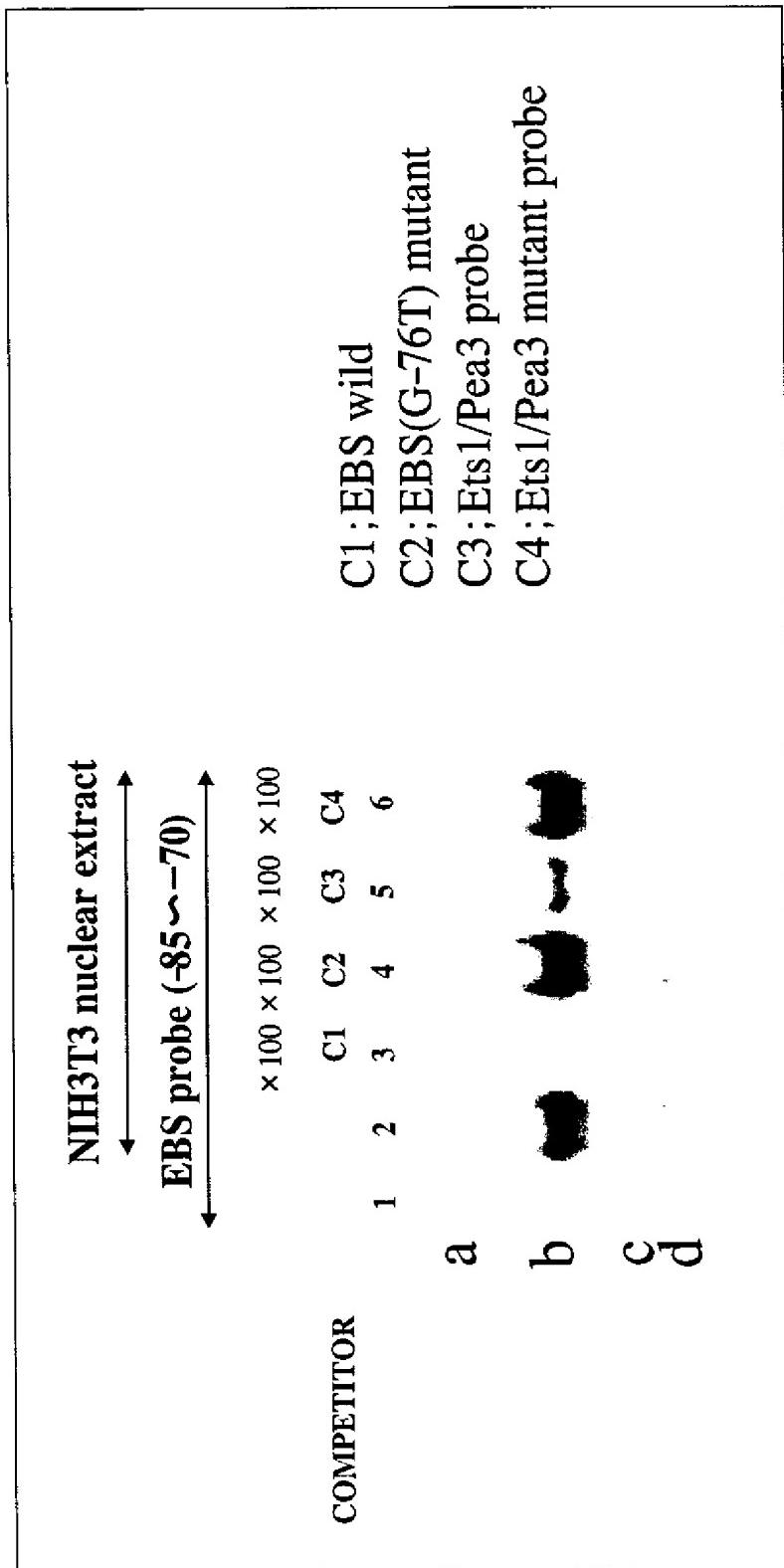
< 96.9% / 97 bp >

	SP1	EBS	AML1
HUMAN	CCCACCCCCCCCCCCCCCCCC	GCGGAA GTCAAGGTGCTTTACCCCC	
MOUSE	ACTCCCCCCCCCCCCCCCCCC	CCGGAA ACTCAAGGTGCTCTACCCCC	
HUMAN	GAA GTT CGG GTTCGCA GGGGGT GGGGAGT GTTGTTAACGGAGGGG		
MOUSE	GAA GTT CGG GTTCGCA GGGGT GGGGAGT GTTGTTAACGGAGGGG		
HUMAN	CAGCCGGCAG	EBS <sup>-1</sup>	NFI / CTF
MOUSE	* * * * *	SP1	

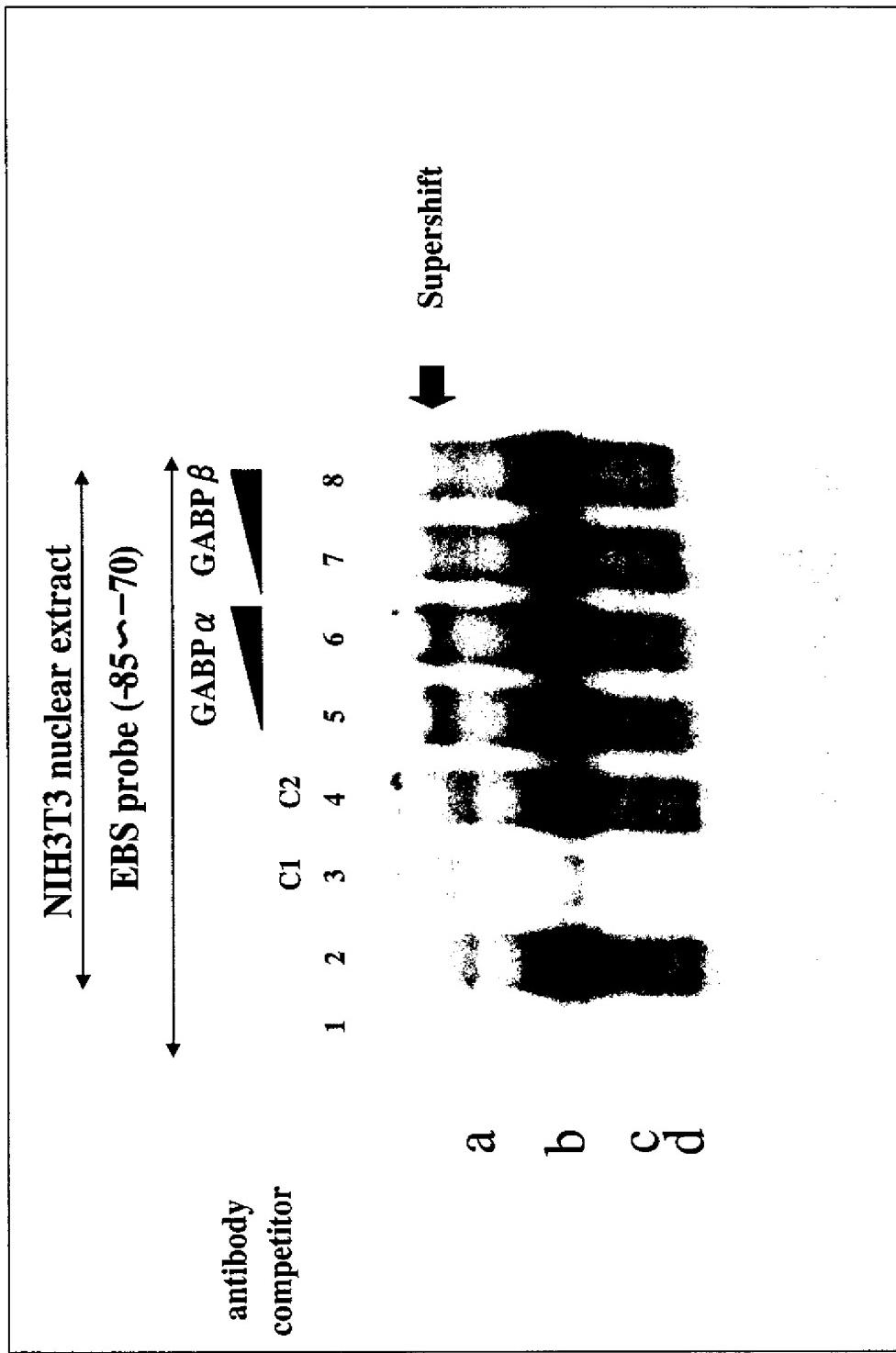
【図 1 D】



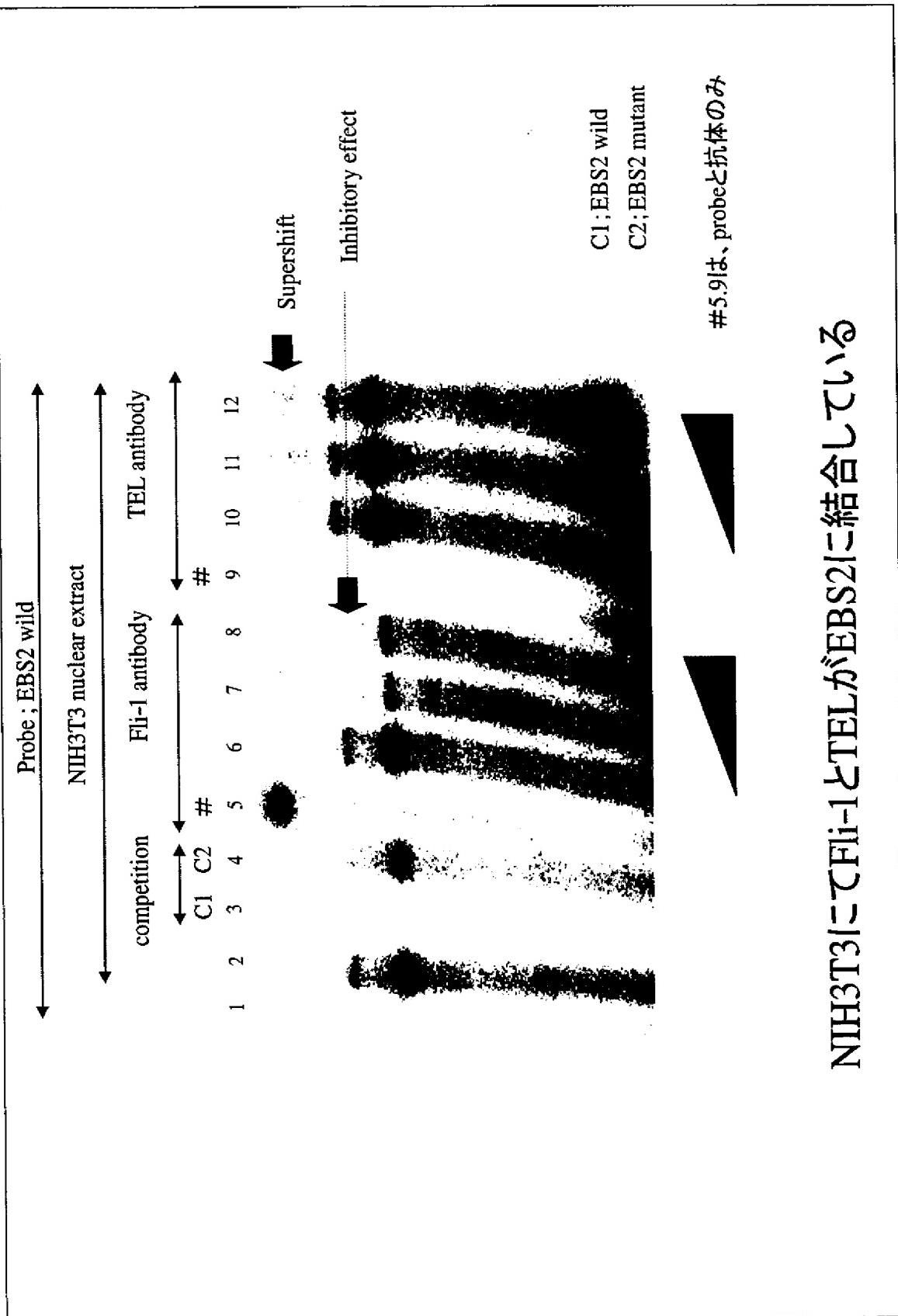
【図 2 A】



【図 2 B】

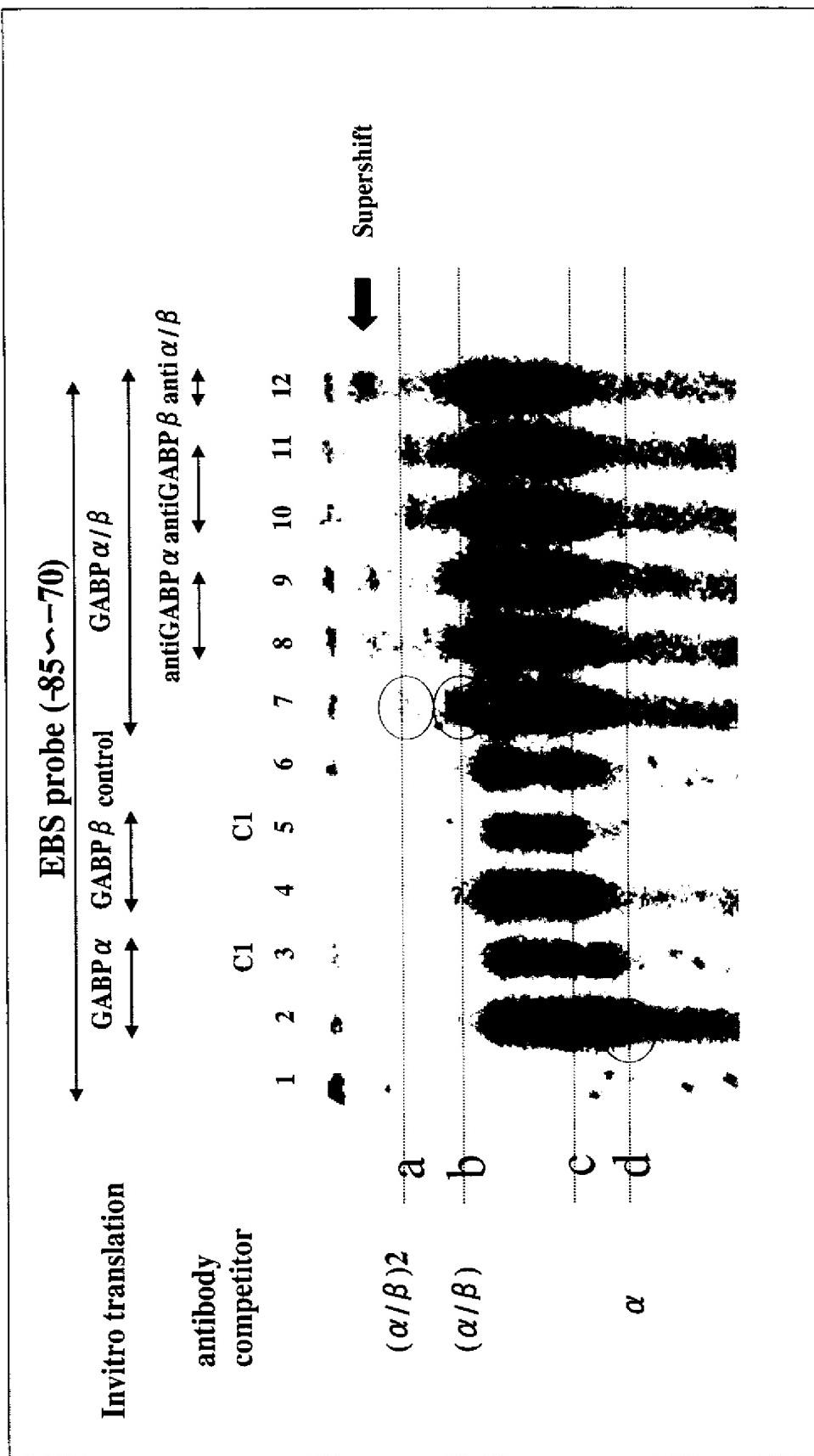


【図 2 C】

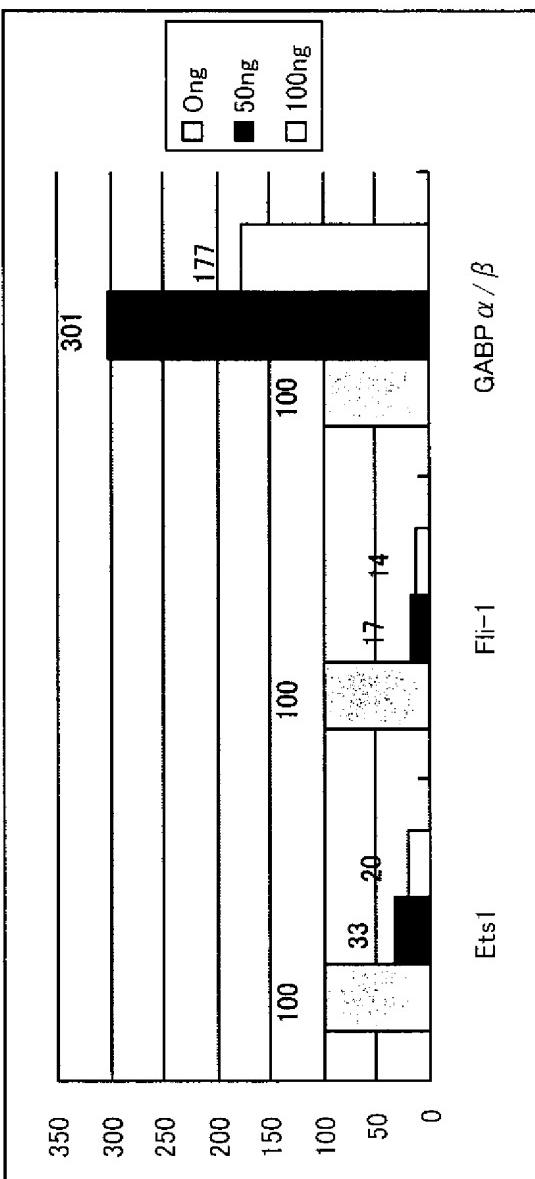


NIH3T3にてFli-1とTELがEBS2に結合している

【図 2 D】



【図 3 A】

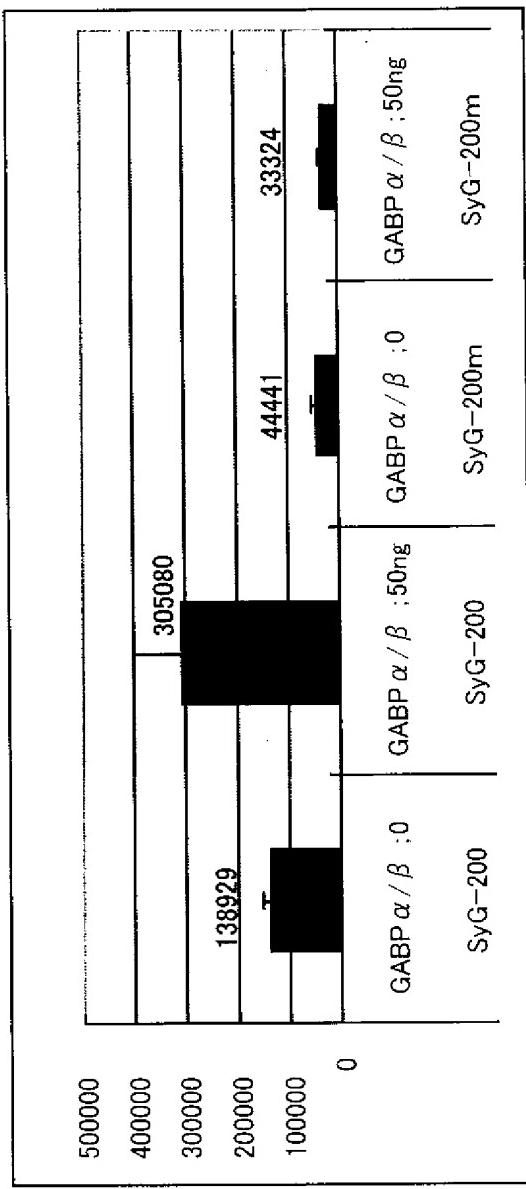


effector

reporter  
SyG-200  
(50ng)

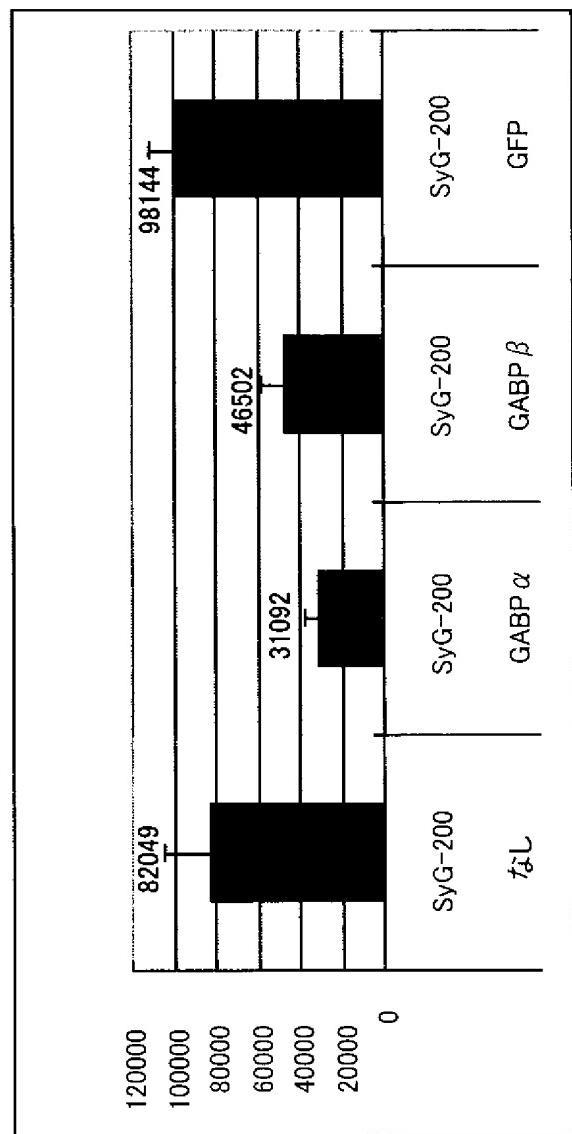
SyG-200  
(50ng)  
(50ng)

【図 3 B】



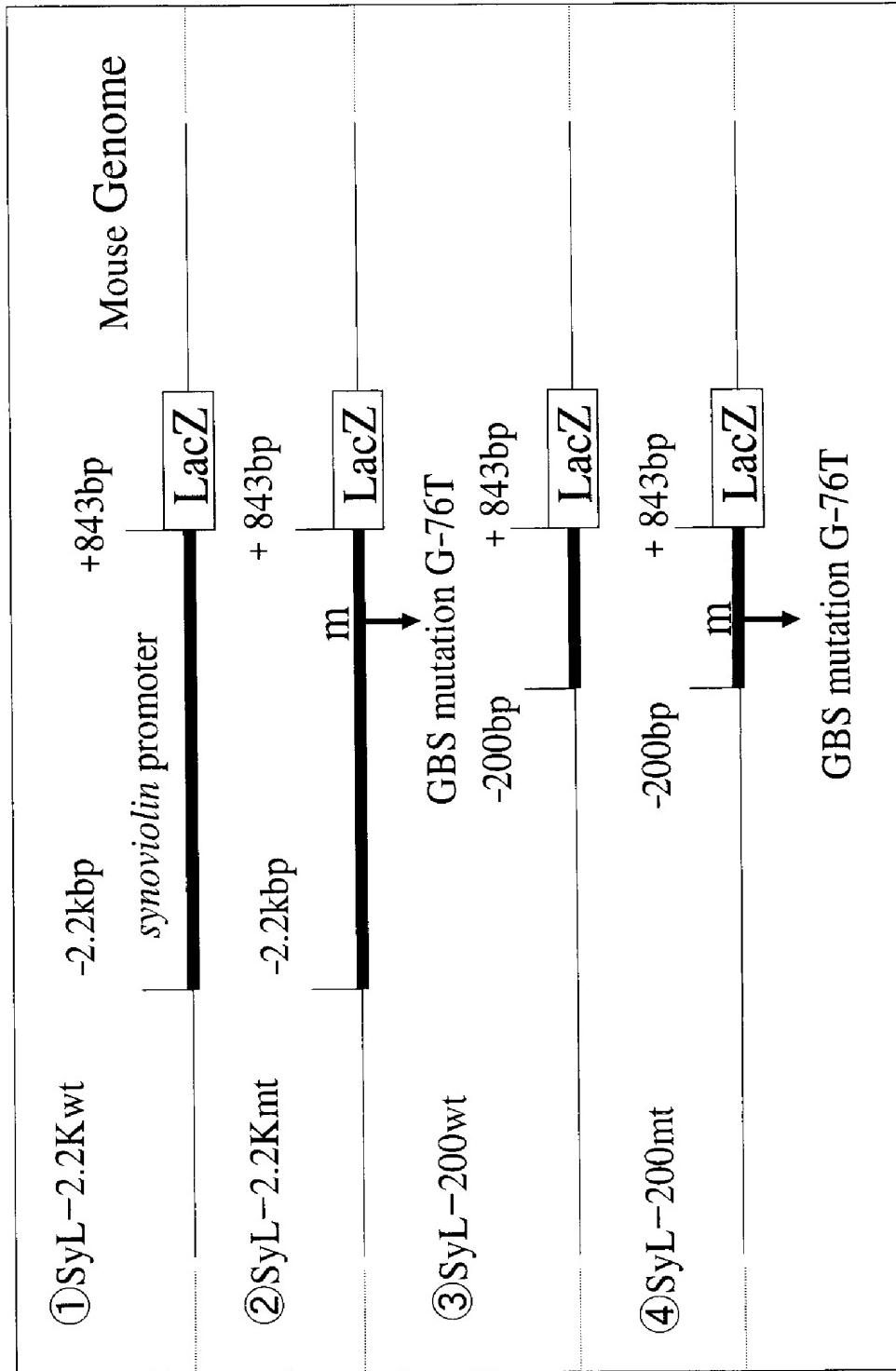
Reporter(50ng)      Wild type      Mutant

【図 3 C】

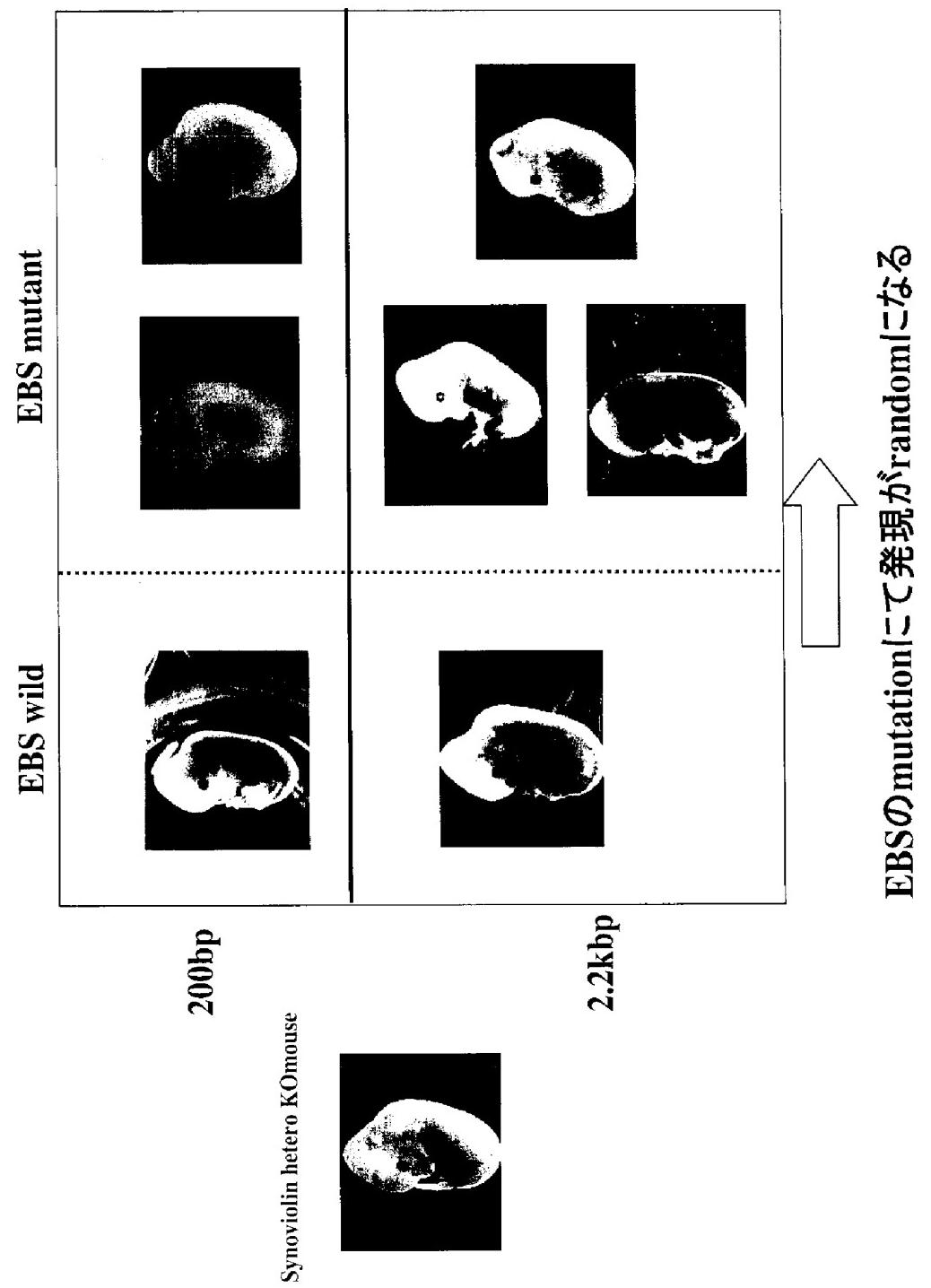


Reporter; 200ng  
RNAi; 40nM

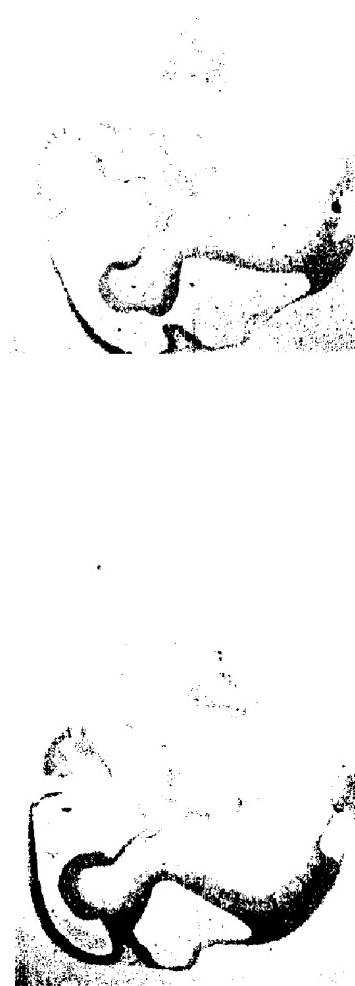
【図 4 A】



【図 4 B】



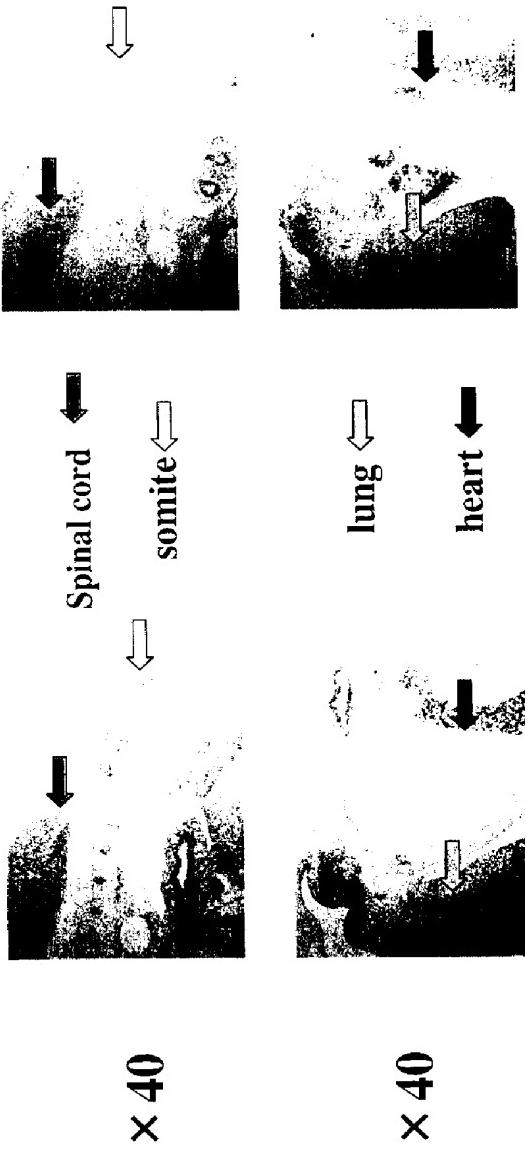
【図 4 C】



$\alpha$  Syno7Ca  $\times 1/100$   
+mouse IgG

GABP  $\alpha$  (C20; sc13442X)  $\times 1/100$   
+goat IgG

$\times 40$

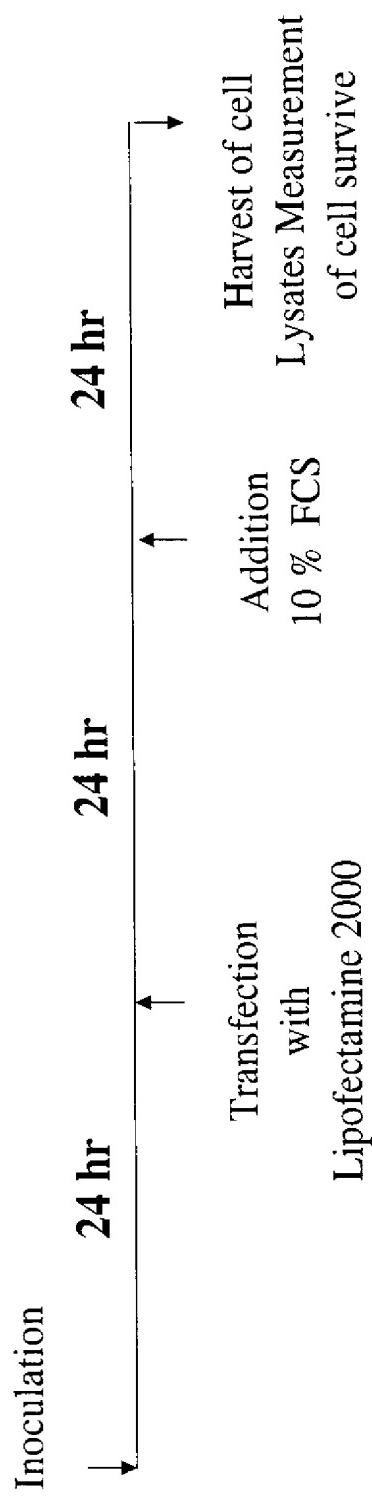


Synoviolin, GABP  $\alpha$  共にユビキタスの発現を認める

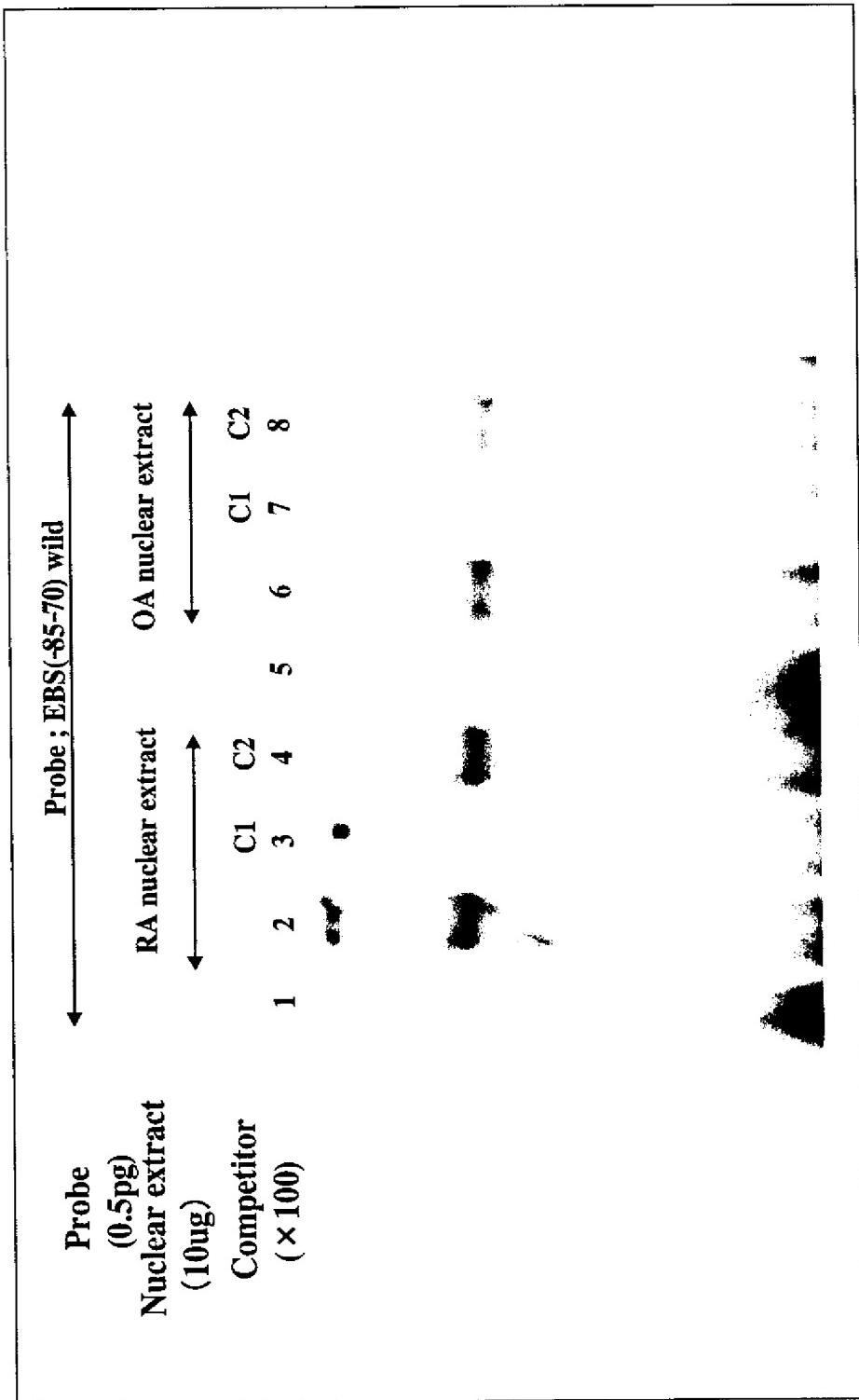
【図5】

Sequence name	Sequence
EBS-Decoy	5'-GCG CCG CGG GAA GTG AGG TG-3' (配列番号11) 3'-CGC GGC GGC CTT CAC TCC AC-5' (配列番号12)
Scrambled (Negative control)	5'-TTG CCG TAC CCT ACT TAG CC-3' (配列番号13) 3'-AAC GGC ATG GGA TGA ATC GG-5' (配列番号14)

【図 6】

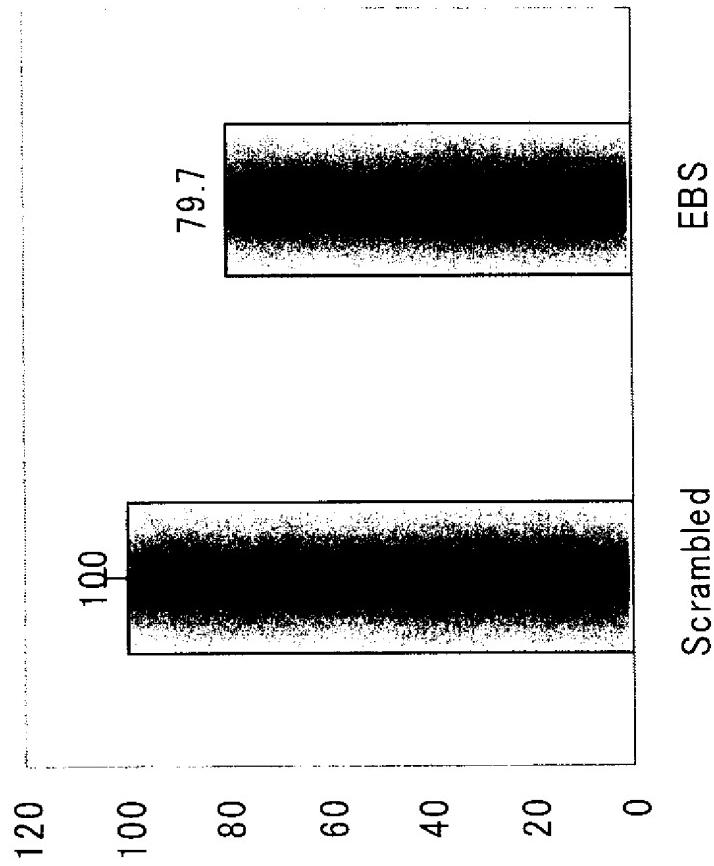


【図 7 A】



【図 7 B】

## Cell survive



## Western blotting



【書類名】要約書

【要約】

【課題】シノビオリン遺伝子のプロモーターに対するデコイ核酸の提供。

【解決手段】シノビオリン遺伝子のプロモーターの転写因子と結合してプロモーター活性を阻害することができるデコイ核酸、並びに以下の(a)又は(b)のデコイ核酸。

(a) 配列番号11若しくは12に示される塩基配列からなるデコイ核酸

(b) 配列番号11若しくは12に示される塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、プロモーター活性を阻害する機能を有するデコイ核酸

【選択図】なし

# 出願人履歴

503302207

20030821

新規登録

301050902

東京都港区虎ノ門4-1-1 虎ノ門バストラル本館7階

株式会社ロコモジエン

503302207

20040806

識別番号の統合による抹消

301050902

東京都港区虎ノ門4-1-1 虎ノ門バストラル本館7階

株式会社ロコモジエン

301050902

20040806

識別番号の二重登録による統合

503302207

東京都港区虎ノ門4丁目1番地1号 虎ノ門バストラル本館 7  
階

株式会社ロコモジエン

301050902

20040806

住所変更

503302207

東京都港区虎ノ門4丁目1番地1号 虎ノ門バストラル本館

7  
階

株式会社ロコモジエン